

Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ecologia

Plasticidade fenotípica de características morfológicas de

Drosophila cardini

Maria Stefânia Przybylska Ribeiro

Dissertação submetida ao Programa
de Pós-Graduação em Ecologia,
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ecologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rosana Tidon

Brasília, março de 2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

Dissertação de Mestrado

MARIA STEFÂNIA PRZYBYLSKA RIBEIRO

Título:

“Plasticidade fenotípica de características morfológicas de
Drosophila cardini”.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Rosana Tidon
Presidente / Orientadora
GEM/UnB

Profa. Dra. Blanche Christine Pires de Bitner-Mathé Leal
Membro Titular
UFRJ

Prof. Dr. Miguel Ângelo Marini
Membro Titular
ZOO/UnB

Prof. Dr. Paulo César Motta
Suplente
ZOO/UnB

Brasília, 18 de março de 2014.

À minha mãe, Elzbieta Przybylska (in memoriam).

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, primeiramente, ao meu pai pelo seu constante apoio, preocupação (sempre perguntando como estavam as moscas) e disposição para ouvir e ajudar. A sua dedicação ao longo da minha vida é certamente o que me fez chegar até aqui. Muito obrigada! Agradeço à minha mãe, por ter incutido em mim o interesse pela busca do conhecimento e pela pesquisa e por me dar forças de uma maneira indescritível. Obrigada também à minha irmã e à Liane, por terem acompanhado com interesse o desenrolar deste trabalho, torcendo comigo pela finalização de cada fase.

Os meus agradecimentos igualmente especiais ao meu namorado, Krishna, por ter participado de cada anseio e de cada estresse, sempre me dando forças para continuar e comemorando comigo cada vitória, por menor que fosse. Muito obrigada por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado!

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Rosana Tidon, pelo papel fundamental na minha formação como pesquisadora e pelo apoio e disposição para discutir ideias e encontrar alternativas quando necessário. Muito obrigada por acreditar no meu trabalho!

Ao Prof. Dr. Louis Bernard Klaczko, pela disponibilidade para tirar dúvidas e pelas sugestões iluminadoras, por assim dizer.

Aos meus amigos da Biologia, Aline, Amanda, Anderson, Chael, Diêgo, Diogo, Ester, Gabriel, Luiza e Thiago, pelas trocas de experiência, apoio e conselhos. O meu agradecimento especial à Aline e à Luiza, minhas amigas do coração, por estarem sempre dispostas a me ouvir nos momentos bons e ruins.

Aos meus colegas do laboratório de Biologia Evolutiva. Agradeço ao Brito, pela parceria no experimento e pelas discussões sobre diversos aspectos do trabalho. À Renata, por estar sempre disposta a tirar dúvidas, discutir e buscar soluções para

problemas encontrados. Ao Pedro Henrique, pela valiosa ajuda na confecção de lâminas de asa, na medição dos tórax e também pelo apoio no decorrer do experimento. À Bárbara pela identificação pela genitália das linhagens utilizadas neste trabalho e de muitas outras que acabaram não sendo utilizadas. Ao Iago, pela confecção de lâminas e fotografias de asas. À Prof.^a Dr.^a Nilda Diniz e ao Benjo, Francisco, Henrique, Jonas, Lorena (namorada do Brito), Marcos, Natália, Pedro Lucas e Pedro Paulo, por terem auxiliado com muita boa vontade em momentos importantes deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia – UnB e aos seus professores, pela formação de alta qualidade proporcionada.

À Reserva Ecológica do IBGE, pela permissão para coleta.

Aos órgãos financiadores desta pesquisa: CAPES, pela bolsa de estudo fornecida, e CNPq, pelos recursos disponibilizados à compra de equipamentos.

Sumário

Resumo.....	1
Abstract	2
1. Introdução	3
Plasticidade fenotípica	4
<i>Drosophila</i> como modelo no estudo de plasticidade fenotípica	7
O modelo deste estudo: <i>Drosophila cardini</i>	10
2. Objetivos	12
3. Materiais e métodos	13
3.1. Estabelecimento de isolinhagens e desenho experimental	13
3.2. Análise das características morfológicas	14
Medição do tórax	15
Medição da asa	16
3.3. Tratamento estatístico	18
Tamanhos da asa e do tórax	19
Forma da asa	21
Análise exploratória da variabilidade populacional	23
4. Resultados	24
4.1. Tamanhos da asa e do tórax	24
Fontes de variação	24
Normas de reação.....	28
4.2. Forma da asa	33
Fontes de variação	33
Influência da temperatura	35
4.3. Análise exploratória da variabilidade populacional	38
5. Discussão	44

Tamanhos da asa e do tórax em resposta à temperatura de desenvolvimento	45
Tamanhos da asa e do tórax em resposta a outras fontes de variação	48
Forma da asa em resposta à temperatura de desenvolvimento	49
Variabilidade em resposta à temperatura de desenvolvimento	52
6. Conclusão	55
7. Referências bibliográficas	56
8. Anexo	64

Lista de figuras

- Fig. 1.** Medição do comprimento do tórax de *D. cardini* realizada, em sua lateral esquerda, da cerda humeral mais anterior à ponta do escutelo16
- Fig. 2.** Asa esquerda de *D. cardini* com os 13 marcos anatômicos utilizados no presente estudo17
- Fig. 3.** Normas de reação para tamanho do centroide e comprimento do tórax das linhagens de *D. cardini* sob diferentes temperaturas de desenvolvimento27
- Fig. 4.** Normas de reação médias para tamanho do centroide, comprimento do tórax e razão asa:tórax pela temperatura de desenvolvimento. As barras verticais são os intervalos de confiança de 95%29
- Fig. 5.** Ajustes das normas de reação médias de tamanho do centroide, comprimento do tórax e razão asa:tórax pela temperatura de desenvolvimento. O modelo utilizado para tamanho do centroide e comprimento do tórax foi o quadrático e, para a razão asa:tórax, foi o linear. As curvas pontilhadas correspondem às normas de reação médias, e as curvas cheias correspondem às curvas ajustadas. As barras verticais são os intervalos de confiança de 95%32
- Fig. 6.** Gráfico de dispersão das duas primeiras variáveis de forma da asa (RW1 e RW2). Cada ponto colorido representa um indivíduo emergido a 14°C (verde), 17°C (vermelho), 21°C (azul), 25°C (rosa) ou 28°C (preto). Ao longo dos eixos, está representada a forma típica da asa (obtida a partir de uma grade de deformação) quando escores extremos do eixo são selecionados. Os pontos dentro das asas correspondem aos marcos anatômicos previamente definidos ..37
- Fig. 7.** Norma de reação média para o módulo do coeficiente de variação (CV) da variável de forma da asa mais explicativa (RW1) pela temperatura de desenvolvimento. As barras verticais são os intervalos de confiança de 95% ...39
- Fig. 8.** Ajustes das normas de reação do coeficiente de variação (CV) do tamanho do centroide (mm) das linhagens 14 (A), 21 (B) e 22 (C) pela temperatura de desenvolvimento. O modelo utilizado em A e C foi o linear e, em B, foi o cúbico. As curvas pontilhadas correspondem às normas de reação, e as curvas cheias correspondem às curvas ajustadas42
- Fig. 9.** Ajustes das normas de reação do coeficiente de variação (CV) do comprimento do tórax (mm) das linhagens 12 (A) e 21 (B) pela temperatura de desenvolvimento. Os modelos utilizados em A e B foram, respectivamente, o

linear e o cúbico. As curvas pontilhadas correspondem às normas de reação, e as curvas cheias correspondem às curvas ajustadas43

Lista de tabelas

- Tabela 1.** Número de indivíduos de *D. cardini* analisados para tamanho do tórax (Tórax), tamanho e forma das asas (Asa) e razão asa:tórax (Razão) em cada linhagem e temperatura experimental (°C)25
- Tabela 2.** Análise de Variância para tamanho da asa (Asa), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão) de *D. cardini* procedentes de diferentes linhagens e temperaturas de desenvolvimento26
- Tabela 3.** Coeficientes de determinação (R^2) resultantes do ajuste de três modelos (linear, quadrático e cúbico) às médias dos dados de tamanho da asa (Asa), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão) nas diferentes temperaturas de desenvolvimento30
- Tabela 4.** Estimativa dos valores característicos das normas de reação quadráticas de tamanho da asa (Asa) e tamanho do tórax (Tórax), seguida do seu erro padrão (e.p.) e do coeficiente de variação (CV). VM: valor máximo. TVM: temperatura do valor máximo31
- Tabela 5.** Análise de Variância Multivariada (MANOVA) e Análise de Covariância Multivariada (MANCOVA) realizadas com as 22 variáveis de forma da asa de *D. cardini* procedentes de diferentes linhagens e temperaturas de desenvolvimento33
- Tabela 6.** Análise de Variância para as duas primeiras variáveis de forma da asa (RW1 e RW2) de *D. cardini* procedentes de diferentes linhagens e temperaturas de desenvolvimento34
- Tabela 7.** Análise de Variância para os coeficientes de variação (CVs) de tamanho do centroide (Asa - centroide), RW1 (Asa – RW1), RW2 (Asa – RW2), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão) de *D. cardini* procedentes de diferentes linhagens e temperaturas de desenvolvimento38
- Tabela 8.** Coeficientes de determinação (R^2) resultantes do ajuste de três modelos (linear, quadrático e cúbico) aos dados de coeficiente de variação (CV) de tamanho da asa (Asa), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão) de diferentes linhagens nas diferentes temperaturas de desenvolvimento41
- Tabela 9.** Estimativa dos valores característicos das normas de reação cúbicas dos coeficientes de variação (CVs) do tamanho da asa (Asa) e do tamanho do tórax (Tórax) da linhagem 21 e da norma de reação quadrática do CV da

razão asa:tórax (Razão) da linhagem 9. VM: valor máximo. TVM:
temperatura do valor máximo41

Tabela A1. Estimativas dos parâmetros (g_0 , g_1 , g_2 e g_3) dos modelos que forneceram os melhores ajustes para tamanho da asa (Asa), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão). Os valores médios das estimativas são seguidos do erro padrão (e.p.) e do coeficiente de variação (CV)64

Tabela A2. Valores dos coeficientes de variação (CV), em porcentagem, calculados por linhagem e temperatura de desenvolvimento (°C) para tamanho do centroide (Asa - centroide), RW1 (Asa – RW1), RW2 (Asa – RW2), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão)65

Tabela A3. Estimativas dos parâmetros (g_0 , g_1 , g_2 e g_3) dos modelos que forneceram os melhores ajustes para o coeficiente de variação (CV) do tamanho da asa (Asa) e do tamanho do tórax (Tórax) de diferentes linhagens. Os valores médios das estimativas são seguidos do erro padrão (e.p.) e do CV68

Resumo. Muitos autores têm chamado a atenção para a necessidade de uma ampliação da Síntese Moderna, incorporando fenômenos anteriormente desconhecidos ou negligenciados, como é o caso da plasticidade fenotípica. O estudo desse fenômeno não é recente, mas, desde a década passada, ele ganhou um novo status devido ao reconhecimento da sua importância no processo evolutivo. Espécies de *Drosophila* têm sido tradicionalmente utilizadas como modelos na investigação de plasticidade fenotípica, mas a maioria dos estudos se concentra no grupo *D. melanogaster* do subgênero *Sophophora*. No presente estudo foi investigada a plasticidade fenotípica de *Drosophila cardini*, uma espécie Neotropical pertencente ao grupo *D. cardini*, focalizando o tamanho e forma da asa, o tamanho do tórax e a razão asa:tórax em linhagens submetidas a diferentes temperaturas de desenvolvimento. Todas as características analisadas responderam plasticamente à temperatura, com normas de reação semelhantes em forma às já obtidas para outras espécies de drosofilídeos e com temperaturas do valor máximo coerentes com a variação térmica encontrada pela população. A forma da asa dos indivíduos de *D. cardini* emergidos a temperaturas mais altas foi interpretada como mais propícia a um melhor desempenho de voo. Além disso, a variabilidade da variável de forma da asa mais explicativa foi maior à temperatura de 25°C em relação à de 14°C, um resultado que diverge do que é normalmente encontrado para *Drosophila*. Os resultados obtidos foram interpretados levando em consideração informações sobre *D. cardini* no Cerrado, onde os casais fundadores das linhagens foram coletados. Entretanto, investigações mais aprofundadas sobre o desempenho de voo da espécie e sobre a influência de condições estressantes na forma da asa são necessárias.

Palavras-chave: norma de reação, temperatura de desenvolvimento, tamanho da asa, forma da asa, tamanho do tórax, razão asa:tórax, morfometria geométrica.

Abstract. Many authors have been calling attention to the necessity of an expansion of the Modern Synthesis, incorporating previously unknown or neglected phenomena, such as phenotypic plasticity. The investigation of this phenomenon is not recent, but it has gained a new status since the last decade thanks to the acknowledgement of its importance in the evolutionary process. *Drosophila* species have been traditionally used as models in phenotypic plasticity investigation, but the majority of the researches are conducted with the *D. melanogaster* group of the *Sophophora* subgenus. In this study, we investigated *Drosophila cardini* phenotypic plasticity, a Neotropical species of the *D. cardini* group, focusing on wing size and shape, thorax length and wing:thorax ratio of lines submitted to different growth temperatures. All the analyzed traits responded plastically to temperature, with reaction norms similar to those already found in other drosophilid species and with temperatures of maximum value consistent with temperature variation encountered by the population. Wing shape of the specimens emerged at higher temperatures was interpreted as being adequate to a better flight performance. Moreover the variability of the most explanatory shape variable was higher at 25°C compared with 14°C, a result that diverges from what is usually found in *Drosophila*. The results here obtained were interpreted taking into account information about *D. cardini* in the Cerrado, where the couples that originated the lines were collected. However, deeper investigations about the species flight performance and the influence of stressful conditions on wing shape are necessary.

Key words: reaction norm, growth temperature, wing size, wing shape, thorax length, wing:thorax ratio, geometric morphometrics.

1. Introdução

O advento da Síntese Moderna (1918-1950) incorporou as descobertas de Mendel à teoria da evolução de Darwin. Posteriormente, com as contribuições da Biologia Molecular acerca de mecanismos específicos de hereditariedade e expressão fenotípica, houve muito avanço no desvendamento das vias que relacionam DNA, RNA e proteínas. Por muito tempo, entretanto, a origem da variabilidade foi associada principalmente a mutações aleatórias que, se vantajosas sob determinadas condições ambientais, aumentavam em frequência na população por meio de seleção natural. A Biologia Evolutiva baseava-se em uma visão “genocêntrica”, não valorizando as descobertas que alertavam para a importância da influência do ambiente na expressão e transmissão de características. Segundo Jablonka & Lamb (2005), essas ideias eram tidas como meras “heresias lamarckistas”.

Esse cenário começou a mudar nas últimas décadas, com os trabalhos de Jablonka & Lamb (1995), Maynard Smith & Szathmary (1995), Schlichting & Pigliucci (1998), Gould (2002), Müller & Newman (2003), Odling-Smee *et al.* (2003), West-Eberhard (2003) e Kirschner & Gerhart (2005), dentre outros. Atualmente, muitos autores chamam a atenção para a necessidade de uma ampliação da Síntese Moderna (Pigliucci & Müller 2010, Schoener 2011, Danchin 2013, Müller 2013), de modo a abarcar as evidências de que o ambiente pode produzir variação fenotípica herdável sobre a qual a seleção natural age. Essa possível Síntese Evolutiva Estendida (Extended Evolutionary Synthesis - EES), que reúne contribuições da ecologia e biologia do desenvolvimento à tradicional genética de populações (Pennisi 2008, Pigliucci & Müller 2010), incorpora novos fenômenos à tradicional Síntese Moderna, e um dos principais é a plasticidade fenotípica (Müller 2007, Pigliucci 2010, Wund 2012).

Plasticidade fenotípica

Plasticidade fenotípica é um fenômeno comum entre os seres vivos (Pigliucci 2001, Schlichting 2002, Wund 2012, Schlichting & Wund 2014) e pode ser definida como a capacidade de um genótipo único exibir uma gama de fenótipos em resposta à variação no ambiente (Pigliucci 2001). O seu estudo não é recente, já que está intrinsecamente relacionado com as ideias de genótipo e influência do ambiente, mas passou a receber mais atenção dos biólogos evolutivos a partir da segunda metade da década de 1980. Ao longo dos anos 1990, vários trabalhos empíricos foram publicados com plasticidade fenotípica (Pigliucci 2001), e, na década passada, muito se argumentou em favor da sua importância no processo evolutivo (Pigliucci 2010, Wund 2012, Schlichting & Wund 2014).

Autores como West-Eberhard (2003) defendem que a mudança fenotípica sempre tem início com uma resposta plástica a alguma alteração genética ou ambiental percebida pelos organismos, e que modificações em termos de frequências alélicas constituem apenas um último passo para a mudança evolutiva, aquele que West-Eberhard (2003) chama de *acomodação genética*. Desse modo, a autora defende que os genes seriam melhor entendidos como “seguidores” no processo evolutivo, e não como “líderes” (West-Eberhard 2003). Os mecanismos a partir dos quais ocorre esse fenômeno, que alguns consideram como lamarckista, têm sido paulatinamente desvendados com o avanço da Epigenética (Jablonka & Lamb 2010). Esses avanços, por sua vez, estão proporcionando um cenário teórico baseado nas dimensões múltiplas dos sistemas de herança evolutivamente relevantes (Jablonka & Lamb 2005, Danchin 2013).

Além de a plasticidade fenotípica ser apontada como fundamental na geração de novidades evolutivas, há várias outras hipóteses sobre como ela pode impactar a evolução (Wund 2012). A importância de se estudar esse fenômeno e suas implicações, entretanto, vai além de dar base ao advento de um novo arcabouço teórico evolutivo. A compreensão de como se dão as respostas complexas dos organismos a mudanças no seu ambiente é relevante por si só, ainda mais no atual cenário global de mudanças climáticas (Merilä & Hendry 2014, Schlichting & Wund 2014). Portanto, é relevante o delineamento de estudos que, em diferentes circunstâncias, contribuem para elucidar as causas e consequências da plasticidade fenotípica.

A plasticidade fenotípica pode ser visualizada por meio de normas de reação. Estas são a representação gráfica do conjunto de fenótipos produzidos por um único genótipo quando exposto a diferentes condições ambientais (Schlichting & Pigliucci 1998). A variação fenotípica de uma característica pode se dar por contribuição ambiental, genética, da interação entre esses dois fatores ou, ainda, de ruídos do desenvolvimento (variação aleatória, não explicada por nenhum dos fatores anteriormente citados). Em uma população de normas de reação, plasticidade fenotípica é entendida como a sensibilidade média da característica analisada às modificações do fator ambiental; a contribuição genética é expressa pela média diferenciada entre genótipos para a característica em questão; e a interação dos dois componentes anteriormente citados, isto é, a variação genética para plasticidade fenotípica, é inferida a partir da obtenção de normas de reação diferentes para cada genótipo (Whitman & Agrawal 2009). Desse modo, experimentos de plasticidade fenotípica têm como condições essenciais: controle das condições ambientais e algum nível de amostragem da variação de origem genética da população analisada.

Atualmente parece haver consenso na literatura de biologia evolutiva a respeito da ação da seleção natural sobre a forma das normas de reação (Pigliucci 2010, Futuyma 2011, Rocha & Klaczko 2012). Entretanto, a maior parte dos estudos com plasticidade fenotípica utiliza dois ou, no máximo, três ambientes para descrição das normas de reação (Rocha & Klaczko 2012). Adicionalmente, os trabalhos que utilizam uma gama de ambientes frequentemente obtêm normas não-lineares para as características analisadas (David *et al.* 2004, Rocha & Klaczko 2012). Desse modo, parece haver incongruência na literatura, segundo a qual, embora se afirme a importância da forma das normas de reação como alvo de seleção natural, continua-se a não descrevê-las em sua completude. É por isso que autores como Rocha & Klaczko (2012) e David *et al.* (2004) chamam atenção para a necessidade de melhor descrição da forma das normas de reação a fim de se avançar no estudo de sua evolução.

Um último ponto importante, que deve ser salientado com relação às análises envolvidas no estudo de plasticidade fenotípica, é que plasticidade fenotípica também pode ser expressa por meio de estimativas de variabilidade de uma determinada característica (David *et al.* 2005). Já que um dos pré-requisitos para a atuação da seleção natural é a existência de variação, a variabilidade populacional das características é de interesse evolutivo. As perguntas que conduzem essa investigação são: “A variabilidade se altera ao longo do gradiente ambiental?”, “Existem linhagens mais variáveis do que outras ao longo desse gradiente?” (David *et al.* 1994).

Apesar de Pigliucci (2010) atribuir à plasticidade fenotípica o status de “um dos fenômenos biológicos mais bem estudados na literatura evolutiva”, ainda há autores céticos com relação à sua importância no processo evolutivo (ex. Futuyma 2011). Devido ao fato de os impactos da plasticidade fenotípica na evolução serem, ao que tudo indica, de natureza diversa, faz-se necessário acumular evidências que indiquem

com que frequência e sob quais circunstâncias essa influência ocorre (Wund 2012). Só então será possível a identificação de padrões gerais do fenômeno da plasticidade fenotípica na natureza (Gianoli & Valladares 2012, Wund 2012).

***Drosophila* como modelo no estudo de plasticidade fenotípica**

Moscas do gênero *Drosophila* têm sido tradicionalmente utilizadas em estudos de evolução devido ao seu ciclo de vida curto, facilidade de amostragem, manipulação e criação de muitas espécies em laboratório (Powell 1997). Além disso, elas são altamente diferenciadas espacialmente (David & Capi 1988, Huey *et al.* 2000, Hoffmann & Shirriffs 2002, Gilchrist & Huey 2004, Sambucetti *et al.* 2006) e particularmente sensíveis a condições ambientais (Tidon 2006, Mata *et al.* 2010, Willi & Hoffmann 2012).

Idealmente, as investigações de plasticidade fenotípica devem ser feitas com indivíduos geneticamente idênticos, mas, ao contrário de plantas, clones de animais não são fáceis de se obter (David *et al.* 2005). Portanto, no caso de drosofilídeos, uma técnica prática e conveniente tem sido utilizada: a técnica de isolinhagem (David *et al.* 2005). Isolinhagens correspondem à progênie de uma única fêmea ou de um único casal advindos do campo. Apesar de a maior parte das fêmeas de drosofilídeos coletadas no campo terem sido inseminadas por mais de um macho (Milkman & Zeitler 1974, Imhof *et al.* 1998), observa-se dominância do esperma do último macho a copular (Simmons 2001). Desse modo, a progênie da única fêmea ou do único casal será, em quase sua totalidade, de irmãos, e obtém-se, assim, maior similaridade genética dentro das isolinhagens do que entre elas (David *et al.* 2005).

Muitos estudos analisaram plasticidade fenotípica a partir de variações morfométricas em asas de *Drosophila* (Moreteau *et al.* 1998, Bitner-Mathé & Klaczko 1999, Debat *et al.* 2003, Bublly *et al.* 2008, Soto *et al.* 2011, Pitchers *et al.* 2012). As asas de drosofilídeos são bons modelos para esse tipo de análise por uma série de razões: 1) o padrão de veias das asas é altamente conservado na família Drosophilidae, o que facilita a identificação de marcos anatômicos homólogos entre espécies; 2) detalhes a respeito do seu desenvolvimento em *Drosophila* são bem compreendidos; 3) a morfologia alar no gênero é altamente plástica, e normas de reação para tamanho da asa têm sido obtidas para muitas espécies (Debat *et al.* 2003); 4) elas têm a função óbvia de possibilitar o voo (uma característica potencialmente adaptativa), sendo, com isso, um possível alvo de seleção natural (Huey *et al.* 2000, Hoffmann & Shirriffs 2002); e, por fim, estão envolvidas no comportamento de corte da maior parte das espécies de *Drosophila* (Markow & O'Grady 2005).

O tamanho do tórax também é uma característica morfológica comumente analisada nos estudos de plasticidade fenotípica com *Drosophila*, pois é um bom estimador do tamanho corporal dessas moscas (David *et al.* 2006). O tamanho corporal, por sua vez, é de interesse porque diversos estudos sugerem que ele seja um bom indicador do valor adaptativo tanto de fêmeas (Partridge 1988) quanto de machos (Partridge 1988, Prasad *et al.* 2008) de *Drosophila*, embora essa questão seja controversa (Partridge & Fowler 1993, Markow *et al.* 1996, Nunney & Cheung 1997, Menezes *et al.* 2013).

Uma outra característica comumente analisada nesse gênero de moscas, que deriva da análise dos tamanhos da asa e do tórax, é a chamada razão asa:tórax, que diz respeito à razão do tamanho da asa pelo tamanho do tórax. Essa característica é bastante interessante, pois é preditora da carga alar da mosca (Pétavy *et al.* 1997).

Dentro da área da aerodinâmica, uma questão crucial para a análise do desempenho de voo está no peso que um par de asas pode suportar (Tennekes 2009). Essa questão depende de uma série de fatores: área das asas, velocidade do voo, densidade do ar e ângulo das asas em relação à direção do voo (Tennekes 2009). A carga alar diz respeito a esse primeiro fator, isto é, à área das asas suportando um determinado peso corporal. A medida de peso corporal pode ser substituída pela massa corporal e, assim, obtém-se a seguinte equação para a carga alar: $\text{carga alar} = \text{massa corporal} / \text{área das asas}$ (Starmer & Wolf 1989). Pétavy *et al.* (1997) validaram a razão asa:tórax como sendo inversamente proporcional à carga alar de *Drosophila*. Desse modo, a razão asa:tórax tornou-se uma preditora conveniente da carga alar, já que é mais simples de se medir do que esta última (Pétavy *et al.* 1997, Hoffmann *et al.* 2007).

Observações de gradientes latitudinais para a razão asa:tórax (Azevedo *et al.* 1998, Karan *et al.* 1998, Gilchrist & Huey 2004, Liefing *et al.* 2009), associados à observação de normas de reação monotonicamente decrescentes com o aumento da temperatura de desenvolvimento em laboratório (Pétavy *et al.* 1997, Karan *et al.* 1999a, Haerty *et al.* 2003, David *et al.* 2006, Chakir *et al.* 2011), fazem crer que essa razão seja alvo de seleção natural, já que está diretamente associada à capacidade de voo. Desse modo, a carga alar de diferentes espécies de *Drosophila* seria evolutivamente ajustada às condições térmicas do seu local de desenvolvimento (Pétavy *et al.* 1997, Frazier *et al.* 2008).

O estudo de plasticidade fenotípica sob uma perspectiva de evolução de normas de reação de características morfológicas tem sido tradicionalmente realizado por um grupo de pesquisa da França, liderado pelo Prof. Dr. Jean Robert David, utilizando como organismos-modelo espécies do gênero *Drosophila*. David *et al.* (2004)

propuseram que o conjunto de dados acumulados pelo grupo dentro dessa linha de pesquisa servisse como uma referência geral denominada de “o paradigma *Drosophila*”.

O modelo deste estudo: *Drosophila cardini*

Drosophila cardini é uma espécie que pertence ao grupo *D. cardini* do subgênero *Drosophila*, o qual é composto por 16 espécies, todas predominantemente Neotropicais em distribuição (Markow & O'Grady 2006). Esse grupo tem sido muito estudado por suas variações características de coloração do abdômen (Brisson *et al.* 2006, Markow & O'Grady 2006), entretanto, até onde se sabe, este é o primeiro trabalho a analisar a plasticidade fenotípica de características morfológicas de *D. cardini*.

D. cardini é uma espécie de ampla distribuição, que ocupa a América do Sul, as ilhas do Caribe e parte da América do Norte (Brake & Bächli 2008), apresentando recentemente novos registros em ilhas do Havaí (Estados Unidos) (Leblanc *et al.* 2009). É encontrada em regiões savânicas em elevada abundância, regiões semi-áridas e matas de galeria (Vilela *et al.* 2002, Mata 2007, Mata & Tidon 2013).

A população de *D. cardini* utilizada neste estudo foi coletada no Cerrado, um bioma caracterizado por um mosaico de fitofisionomias vegetais, em que predomina a vegetação savânica, mas que também possui formações florestais como matas de galeria (Marinho-Filho *et al.* 2010). Além da variação espacial, o Cerrado também é marcado por forte sazonalidade, apresentando duas estações bem definidas: a chuvosa (novembro – março) e a seca (maio – setembro). As temperaturas médias máximas e mínimas são de cerca de 28 e 17°C para a estação chuvosa e de 28 e 12°C para a seca. *D. cardini*, como a maior parte dos outros drosofilídeos presentes no Cerrado, apresenta pico

populacional na estação chuvosa, quando os recursos para criação larval são abundantes (Tidon 2006, Valadão *et al.* 2010, Roque *et al.* 2013, Valadão 2013).

2. Objetivos

Nesta dissertação é abordada a plasticidade fenotípica de quatro características morfológicas de *Drosophila cardini*: tamanho e forma da asa, tamanho do tórax e razão asa:tórax. Os objetivos específicos deste estudo são:

1. Investigar a presença de plasticidade fenotípica em cinco temperaturas de desenvolvimento;
2. quantificar a contribuição de outras fontes de variação (isto é, as relativas ao genótipo e à interação genótipo X temperatura) visando principalmente avaliar a contribuição relativa da temperatura como fator explicativo da variação observada;
3. traçar normas de reação médias e descrever a sua forma para as características de tamanho e para a razão asa:tórax;
4. investigar, em caráter exploratório, a variabilidade populacional de todas as características analisadas nas diferentes temperaturas de desenvolvimento.

3. Materiais e métodos

3.1. Estabelecimento de isolinhagens e desenho experimental

O experimento de plasticidade fenotípica foi realizado pela técnica de isolinhagem (David *et al.* 2005). Para fundar as isolinhagens de *D. cardini*, foi realizada uma coleta no mês de abril de 2013 em áreas de cerrado *sensu stricto* da Reserva Ecológica do IBGE, localizada 26 km ao sul de Brasília (15°56'S, 47°53'W). Os indivíduos capturados foram então triados para a presença de *D. cardini* ou de sua espécie críptica, *Drosophila cardinoides*, utilizando, para tanto, uma chave dicotômica (Freire-Maia & Pavan 1949). Casais foram formados e mantidos a 25°C, sendo transferidos de meio de cultura a cada três dias para evitar elevada densidade larval. A primeira geração nascida em laboratório (F1) de cada linhagem foi endocruzada e, por ocasião da eclosão da segunda geração de laboratório (F2), um macho de cada linhagem foi usado para a determinação da espécie, mediante a análise de sua genitália (Vilela *et al.* 2002). Quinze linhagens de *D. cardini* foram então utilizadas no experimento.

Visando ao estabelecimento de réplicas, foram separados pelo menos dois grupos de 10 casais de cada linhagem (um grupo por frasco) para que as fêmeas ovipositassem a 25°C em meio de cultura com ácido propiônico por cerca de 24h. Outras condições ambientais também foram padronizadas entre os grupos de casais, como a quantidade de meio de cultura e o espaço livre nos frascos. Vinte ovos visualmente sadios por linhagem e por réplica foram transferidos para frascos contendo 20 ml de meio de cultura de fubá que, à medida em que eram completados, eram distribuídos sequencialmente a um de cinco tratamentos: 14°C, 17°C, 21°C, 25°C ou 28°C. Um total de 60 ovos por linhagem e por réplica foi colocado em cada tratamento

(três frascos de 20 ovos cada). Foram então coletados 300 ovos por linhagem e por réplica (60 ovos X 5 tratamentos).

Para a manutenção dos tratamentos constantes de temperatura foram utilizadas estufas BOD, que os mantinham com uma margem de erro de cerca de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Dentro das diferentes estufas, a umidade manteve-se aproximadamente a mesma e, para evitar qualquer efeito de microclima, as bandejas com frascos foram alternadas de prateleira uma vez por dia até o final do experimento.

Os adultos emergidos em cada tratamento foram retirados das estufas diariamente, transferidos para frascos com meio de cultura novo e mantidos vivos a 21°C por alguns dias. Eles foram, então, mortos com éter e cerca de 10 fêmeas por linhagem, por réplica e por tratamento foram analisadas. Em todas as etapas do experimento as moscas vivas foram mantidas sob um regime de fotoperíodo de 12h/12h.

3.2. Análise das características morfológicas

As fêmeas tiveram seu abdômen retirado (para análises que não fazem parte do escopo do presente trabalho) e foram conservadas em álcool 70% a -22°C . Suas asas foram retiradas para a confecção de lâminas, que posteriormente foram fotografadas com uma câmera acoplada a estereomicroscópio (Leica MZ16). O tórax, imerso em água, foi posicionado em sua lateral esquerda e fotografado com o mesmo equipamento.

Quatro medidas foram então tomadas: o tamanho do tórax, o tamanho e a forma da asa esquerda e a razão asa:tórax, entendida como o tamanho da asa dividido pelo tamanho do tórax (Hoffmann *et al.* 2007, Liefting *et al.* 2009).

Medição do tórax

O tamanho de cada tórax foi estimado pelo seu comprimento, tendo sido este medido nas fotos em ordem aleatória, de modo a distribuir o erro inerente à medição uniformemente entre as linhagens, as réplicas e os tratamentos. A medida foi tomada da cerda humeral mais anterior à ponta do escutelo (James *et al.* 1997, Hoffmann *et al.* 2007, Liefting *et al.* 2009) (Fig. 1) no programa LAS 3.8.0 (Leica 2003-2011). Posteriormente houve a correção das medidas, já que um teste feito com lâmina milimetrada indicou que 0,5 mm medidos no programa correspondiam a 0,34 mm reais.

Devido à tridimensionalidade do tórax e à consequente maior dificuldade de se padronizar o seu posicionamento entre os indivíduos para se evitar um possível viés na medição, foi realizado um teste de repetibilidade para a característica de tamanho do tórax. Trinta indivíduos da amostra foram selecionados aleatoriamente entre as linhagens, réplicas e tratamentos e renumerados de um a trinta. Eles foram fotografados três vezes em ordens e dias diferentes, e a medição foi então realizada. O cálculo de repetibilidade das medidas seguiu a metodologia proposta por Lessells & Boag (1987), e as medidas repetidas mostraram-se altamente correlacionadas ($r > 0,98$).



Fig. 1. Medição do comprimento do tórax de *D. cardini* realizada, em sua lateral esquerda, da cerda humeral mais anterior à ponta do escutelo.

Medição da asa

Tamanho e forma das asas dos indivíduos foram estimados pela técnica de morfometria geométrica (Rohlf & Marcus 1993). Para tanto, as fotos das asas esquerdas foram exportadas em ordem aleatória (pelos mesmos motivos acima apresentados) para o programa tpsDig 2.16 (Rohlf 2010a), e 13 marcos anatômicos do Tipo 1 (Bookstein 1991) foram posicionados em interseções e terminações de veias de cada asa (Fig. 2).

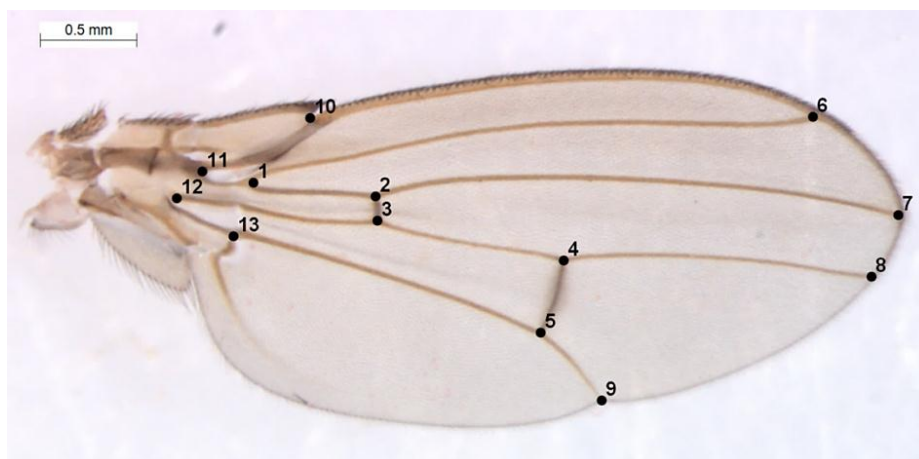


Fig. 2. Asa esquerda de *D. cardini* com os 13 marcos anatômicos utilizados no presente estudo.

As configurações de marcos anatômicos das asas foram então sobrepostas à configuração-consenso (isto é, à média das configurações) por meio da Análise Generalizada de Procrustes (GPA) (Rohlf & Slice 1990, Bookstein 1991, Dryden & Mardia 1998). Esse procedimento foi realizado com o programa tpsRelw 1.49 (Rohlf 2010b) e consiste de três passos: (1) escalonamento, segundo o qual é retirado o efeito de tamanho das configurações de marcos anatômicos escalonando-as a um tamanho de centroide (isto é, a raiz quadrada da soma das distâncias quadradas dos marcos anatômicos ao centroide, ou centro de massa) unitário; (2) translação, segundo a qual todas as configurações, a partir de seus próprios centroides, são sobrepostas pelo centroide da configuração-consenso; e (3) rotação, quando as configurações de marcos anatômicos são rotacionadas em torno dos seus centroides sobrepostos de forma a minimizar as distâncias entre os marcos anatômicos de cada configuração. Esse procedimento fornece dois dados principais: o tamanho do centroide de cada asa, entendido como uma medida de tamanho da asa independente da sua forma (Zelditch *et al.* 2004); e coordenadas de forma das asas, sobre as quais uma análise subsequente (análise de *relative warps*) é aplicada para visualização das mudanças mais típicas na forma (a partir da configuração-consenso) e ordenação dos espécimes de acordo com

essas mudanças. Assim, a morfometria geométrica permite a independência de duas informações morfológicas frequentemente correlacionadas, o tamanho e a forma das asas.

A análise de *relative warps* baseia-se em uma função (a função de *thin-plate splines*) aplicada às coordenadas x,y dos marcos anatômicos de cada espécime alinhado. Essa função verifica variação entre os espécimes em termos de uma matriz de gasto de energia, isto é, uma matriz da energia que precisa ser despendida para a transformação da configuração-consenso em cada uma das configurações digitalizadas. O produto final dessa análise é um conjunto de componentes principais, denominados *relative warps* (Rohlf 1993), que descrevem completamente qualquer mudança na forma (Zelditch *et al.* 2004) e, portanto, correspondem às variáveis de forma utilizadas nas análises estatísticas. O número de *relative warps* gerados corresponde ao número de coordenadas x,y digitalizadas menos quatro graus de liberdade (referentes à retirada dos efeitos de tamanho, de posição ao longo dos dois eixos perpendiculares e de orientação das configurações de marcos anatômicos). Desse modo, o número de *relative warps* produzidos no presente estudo foi de 22 (segundo a fórmula $2K-4$, em que $K = 13$ marcos anatômicos selecionados).

3.3. Tratamento estatístico

Em razão do baixo número amostral de fêmeas emergidas ($n < 8$) em diversas réplicas, principalmente nas temperaturas extremas, as réplicas de cada linhagem foram agrupadas para proceder às análises estatísticas. Sabe-se que esse procedimento pode causar um viés na análise, mas este deve ser mínimo, já que os adultos que geraram a F3

(isto é, as moscas submetidas aos tratamentos térmicos) são netos da mesma avó e são resultado do endocruzamento de uma geração, a F1. Além disso, pelo fato de o conjunto de dados ser desbalanceado (principalmente em razão da baixíssima taxa de eclosão de adultos a 14°C), a soma dos quadrados das Análises de Variância realizadas foi definida como sendo do Tipo III, o qual é o mais indicado para conjuntos de dados desbalanceados (Quinn & Keough 2002). Os testes DHS de Tukey também foram realizados em sua versão modificada, destinada a conjuntos de dados desbalanceados (StatSoft 2005).

Todas as análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa STATISTICA versão 7.1 (StatSoft 2005).

Tamanhos da asa e do tórax

As variações observadas nos tamanhos da asa e do tórax e na razão asa:tórax foram avaliadas como possíveis efeitos das temperaturas, das linhagens e da interação temperatura X linhagem. Esses efeitos foram estimados pela Análise de Variância (ANOVA), utilizando o delineamento misto, no qual temperatura foi tratada como um fator fixo e linhagem e a interação temperatura X linhagem, como fatores aleatórios. Foram, então, traçadas normas de reação e realizados testes DHS de Tukey para verificação a posteriori das diferenças entre os pares de temperaturas.

A análise da forma das normas de reação médias foi realizada ajustando-se aos dados de tamanho da asa, tamanho do tórax e razão asa:tórax polinômios de grau crescente (Rocha & Klaczko 2012), do primeiro ao terceiro graus. O ajuste foi realizado por meio do procedimento padrão de ajuste de curvas: regressão múltipla da variável dependente pela variável independente elevada à potência um, elevada às potências um e dois e, por fim, elevada às potências um, dois e três (Sokal & Rohlf 1995, Zar 1999).

Esse procedimento visa identificar quais variáveis independentes aumentam significativamente o coeficiente de determinação (R^2), o que, por sua vez, pode indicar o modelo que melhor se ajusta aos dados. Para testar se a adição de um termo, seja este o quadrático ou o cúbico, leva a esse aumento significativo, foi calculada a estatística-F a partir dos resultados de uma ANOVA efetuada no procedimento de regressão múltipla (StatSoft 2005). O valor de F foi calculado segundo Rocha & Klaczko (2012) – em que SQ é a soma dos quadrados, QM é o quadrado médio, os graus de liberdade do numerador correspondem a 1 e os do denominador correspondem aos graus de liberdade residuais do modelo de maior grau:

$$F = \frac{(SQ \text{ da regressão para o modelo de maior grau}) - (SQ \text{ da regressão para o modelo de menor grau})}{QM \text{ residual para o modelo de maior grau}}$$

O ajuste polinomial da norma de reação, entretanto, não deve levar em conta apenas o crescente coeficiente de determinação, que tende inevitavelmente a se elevar com o aumento do grau do polinômio ajustado (David *et al.* 2006). Isso ocorre porque é mais difícil interpretar a significância biológica das normas de reação ajustadas a polinômios de quarto grau em diante (David *et al.* 2006). Desse modo, foram calculados valores característicos das normas de reação significativamente melhor ajustadas aos polinômios de segundo e terceiro graus, que são: o valor máximo da característica analisada (VM) e a temperatura em que a característica atinge esse valor máximo (TVM) (David *et al.* 1997, David *et al.* 2006). O objetivo desse cálculo foi verificar a plausibilidade dos valores característicos com base nas normas de reação obtidas e na biologia da espécie analisada para validar ou não o ajuste indicado na análise dos coeficientes de determinação. A estimativa do VM e da TVM para as normas de reação ajustadas ao segundo grau foi realizada utilizando o procedimento não-linear de

estimação (StatSoft 2005, David *et al.* 2006). Já para as normas ajustadas ao terceiro grau, essa mesma estimativa foi realizada por meio das seguintes equações (David *et al.* 1997):

$$TVM = \frac{g_2 + \sqrt{g_2^2 - 3g_1g_3}}{-3g_3}$$

$$VM = g_0 + g_1 TMV + g_2 TMV^2 + g_3 TMV^3,$$

em que TVM é a temperatura do valor máximo; VM é o valor máximo; e g_0 , g_1 , g_2 e g_3 são os coeficientes polinomiais calculados pelo procedimento de regressão múltipla (StatSoft 2005).

A matriz de dados utilizada para os ajustes polinomiais correspondeu aos valores médios da característica analisada em cada temperatura, já que os ajustes utilizando a matriz total costumam fornecer coeficientes de determinação mais baixos (David *et al.* 2006), o que também foi observado no presente estudo.

Forma da asa

As variações na forma da asa foram avaliadas como possíveis efeitos das temperaturas, das linhagens e da interação temperatura X linhagem pela Análise de Variância Multivariada (MANOVA). Para tanto, as variáveis dependentes foram definidas como os 22 *relative warps* gerados pela técnica de morfometria geométrica. ANOVAs mistas também foram realizadas para os dois primeiros *relative warps* (RW1 e RW2), isto é, aqueles que explicam a maior parte da variação observada. Neste caso, a temperatura foi tratada como um fator fixo, e linhagem e a interação temperatura-linhagem como fatores aleatórios.

Dado que alometria é frequentemente observada em asas de insetos (Stern & Emlen 1999, Debat *et al.* 2003), faz-se necessário retirar o efeito do tamanho sobre a variação de forma das asas. Por isso, foi inicialmente realizada uma regressão multivariada das variáveis de forma pelo tamanho do centroide utilizando o programa tpsRegr 1.40 (Rohlf 2011), a qual foi testada pelo teste F de Goodall, com 10.000 permutações aleatórias (Monteiro 1999). Associado a essa análise, foram geradas grades de deformação pelo programa tpsRegr 1.40 (Rohlf 2011) para observação da variação alométrica de forma das asas. A Análise de Covariância Multivariada (MANCOVA) com os 22 *relative warps*, assumindo o tamanho do centroide como covariável, foi utilizada para verificar se os resultados da MANOVA anteriormente realizada tinham se alterado após ter sido retirada, das variáveis de forma, toda e qualquer influência do tamanho das asas, isto é, após apenas a forma não-alométrica das asas ter sido avaliada. Análises de Covariância (ANCOVAs) mistas para RW1 e RW2 também foram realizadas, definindo-se fatores fixos e aleatórios do mesmo modo anteriormente descrito para as ANOVAs mistas. Um teste DHS de Tukey foi realizado a posteriori para RW1 e RW2 com o objetivo de verificar diferenças entre os pares de temperaturas.

Por fim, com o intuito de observar possíveis agrupamentos de indivíduos nas diferentes temperaturas, foi feito um gráfico de dispersão do RW1 pelo RW2, e testes DHS de Tukey foram realizados a posteriori para contrastar os pares de temperaturas. Além disso, grades de deformação geradas pela análise de morfometria geométrica foram utilizadas para observação da mudança de forma da asa (em relação à média) associada a escores extremos tanto de RW1 quanto de RW2.

Análise exploratória da variabilidade populacional

Esta análise foi aplicada às quatro características avaliadas no presente trabalho. A variabilidade populacional foi estimada pelo coeficiente de variação (CV), o qual permite comparar características com variâncias distintas por ser uma medida relativa (David *et al.* 1994, David *et al.* 2006). O CV foi calculado em cada linhagem e temperatura para tamanho da asa, tamanho do tórax, razão asa:tórax, RW1 e RW2, sendo que para estes dois últimos foi utilizado o módulo da medida.

Esses dados foram submetidos à ANOVA de um fator para avaliar o efeito da temperatura sobre as diferenças de variabilidade média na população. O teste DHS de Tukey foi utilizado a posteriori para contrastar os pares de temperatura.

Devido ao fato de não haver réplicas das linhagens (pois, como anteriormente explicado, elas foram agrupadas em uma única amostra em razão do baixo número amostral), não foi possível testar o efeito da interação temperatura X linhagem para os CVs com uma ANOVA fatorial, a qual indicaria se há ou não variabilidade diferencial entre linhagens ao longo do gradiente térmico. Optou-se, desse modo, por traçar, para cada linhagem, normas de reação dos CVs das características listadas pela temperatura de desenvolvimento e tentar ajustá-las aos modelos linear, quadrático ou cúbico (do mesmo modo descrito no item *Tamanhos da asa e do tórax*). A existência de variação no ajuste entre as linhagens foi interpretada como uma demonstração da existência de variabilidade diferencial entre elas.

4. Resultados

Foram analisadas 808 fêmeas de *D. cardini*, distribuídas entre as diferentes linhagens e temperaturas (Tabela 1). O baixo número de indivíduos a 14°C deveu-se, sobretudo, à baixíssima taxa de eclosão de adultos nesse tratamento. Cinco linhagens foram retiradas das análises estatísticas envolvendo asa porque não produziram amostras analisáveis a 14°C (além da baixa taxa de eclosão, foram observados indivíduos com asas quebradas ou veias incompletas). Desse modo, restaram dez linhagens para as análises com asas. Da mesma forma, três linhagens foram eliminadas das análises de tórax (também devido à baixa taxa de eclosão associada à presença de anomalias), restando, portanto, 12 linhagens para essas análises.

4.1. Tamanhos da asa e do tórax

Fontes de variação

A temperatura foi a principal fonte de variação para os tamanhos da asa e do tórax e para a razão asa:tórax, confirmando, portanto, a presença de plasticidade fenotípica nessas características (Tabela 2). A heterogeneidade genética (representada pela fonte de variação “linhagem”) também foi significativa, mas apenas para o tamanho da asa e sua relação com o tórax (Tabela 2). Essa alta significância deveu-se à diferença de várias linhagens entre si (resultados não apresentados). Já a interação temperatura X linhagem foi significativa para os tamanhos da asa e do tórax (Tabela 2), o que indica que, para essas características, as normas de reação das diferentes linhagens não são paralelas, isto é, exibem diferentes formas, entrecruzando-se (Fig. 3).

Tabela 1. Número de indivíduos de *D. cardini* analisados para tamanho do tórax (Tórax), tamanho e forma das asas (Asa) e razão asa:tórax (Razão) em cada linhagem e temperatura experimental (°C).

Temperatura		Linhagem												Total
		3	4	9	10	12	14	15	16	17	18	21	22	
Tórax (n=792)	14	2	3	2	5	2	9	6	3	4	4	3	5	48
	17	12	13	13	12	10	15	16	11	17	15	19	20	173
	21	18	24	20	21	14	20	18	16	19	21	19	15	225
	25	16	25	26	13	12	10	21	30	14	9	20	20	216
	28	6	16	7	9	9	11	11	16	12	5	13	15	130
Asa (n=639)	14	—	3	2	3	—	6	3	2	5	3	2	2	31
	17	—	13	13	12	—	14	16	11	17	14	13	21	144
	21	—	23	16	19	—	20	17	17	19	20	20	15	186
	25	—	24	23	13	—	10	20	27	13	8	20	20	178
	28	—	15	4	8	—	10	10	15	9	5	10	14	100
Razão (n=623)	14	—	3	2	3	—	6	3	2	4	3	2	2	30
	17	—	13	13	11	—	14	16	9	16	14	12	20	138
	21	—	23	16	19	—	20	17	15	19	20	19	15	183
	25	—	23	23	12	—	10	20	27	13	8	20	20	176
	28	—	12	4	8	—	10	10	15	9	5	9	14	96

Tabela 2. Análise de Variância para tamanho da asa (Asa), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão) de *D. cardini* procedentes de diferentes linhagens e temperaturas de desenvolvimento.

	Fonte de variação	g.l.	QM	F	P
Asa	Temperatura	4	4,835	307,7	< 0,001
	Linhagem	9	0,029	2,2	0,037
	Temperatura X Linhagem	36	0,016	1,9	0,002
	Erro	589	0,009		
Tórax	Temperatura	4	0,469	129,6	< 0,001
	Linhagem	11	0,005	1,7	0,102
	Temperatura X Linhagem	44	0,004	2,3	< 0,001
	Erro	732	0,002		
Razão	Temperatura	4	0,543	120,8	< 0,001
	Linhagem	9	0,019	4,4	< 0,001
	Temperatura X Linhagem	36	0,005	1,1	0,289
	Erro	573	0,004		

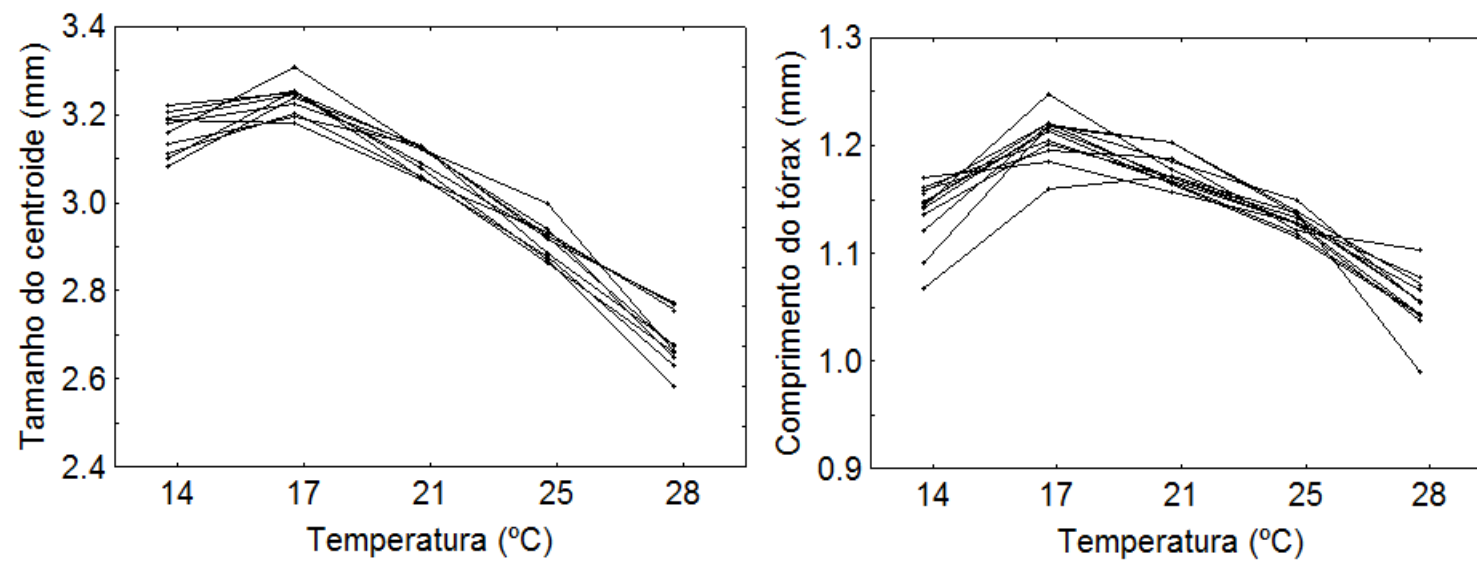


Fig. 3. Normas de reação para tamanho do centroide e comprimento do tórax das linhagens de *D. cardini* sob diferentes temperaturas de desenvolvimento.

Normas de reação

Todas as normas de reação médias obtidas foram responsivas (Fig. 4), confirmando o forte efeito da temperatura sobre os tamanhos da asa e do tórax, e a razão entre eles, em *D. cardini*. Assim, reafirma-se a existência de plasticidade em resposta à temperatura para as características analisadas.

As normas de reação para o tamanho da asa e o do tórax foram côncavas e com um máximo em torno de 17°C (Fig. 4). Acima dessa temperatura, observou-se acentuado declínio no valor de ambas as características. Para tamanho do tórax, entretanto, o declínio, quando a temperatura decresceu de 17 para 14°C, foi tão pronunciado (Fig. 4) que as moscas emergidas a 14 e 25°C não apresentaram diferença significativa entre si para essa característica (Tukey: $P = 0,790$). A razão asa:tórax, por sua vez, apresentou uma norma de reação que decresce monotonamente de 14 a 28°C (Fig. 4). Na análise da forma dessas normas de reação, o aumento do R^2 acompanhou o aumento do grau do polinômio ajustado (Tabela 3), conforme esperado.

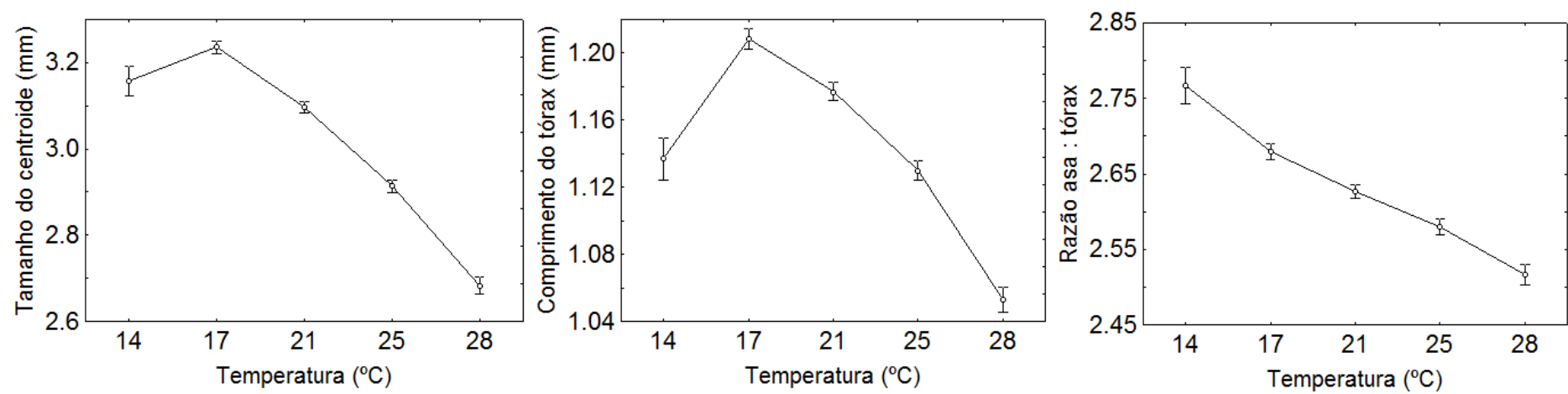


Fig. 4. Normas de reação médias para tamanho do centroide, comprimento do tórax e razão asa:tórax pela temperatura de desenvolvimento. As barras verticais são os intervalos de confiança de 95%.

Tabela 3. Coeficientes de determinação (R^2) resultantes do ajuste de três modelos (linear, quadrático e cúbico) às médias dos dados de tamanho da asa (Asa), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão) nas diferentes temperaturas de desenvolvimento.

Característica	R^2		
	Modelo linear	Modelo quadrático	Modelo cúbico
Asa	0,843*	0,989*	0,992
Tórax	0,474	0,947	0,973
Razão	0,972**	0,978*	0,999**

* < 0,05, ** < 0,01

Para o tamanho da asa, o modelo cúbico não gerou um valor de R^2 significativo (Tabela 3) e, portanto, testou-se o ajuste após a adição do termo quadrático. O R^2 gerado pelo ajuste quadrático foi significativamente maior em relação àquele gerado pelo ajuste linear ($F = 26,03$, g.l. = 2, $P < 0.05$) e, assim, os valores característicos “VM” e “TVM” foram calculados. Os valores obtidos foram plausíveis e de variabilidade não muito alta (Tabela 4) e, com isso, pôde-se assumir a forma da norma de reação do tamanho da asa como quadrática (Fig. 5).

Para o tamanho do tórax, nenhum ajuste mostrou-se estatisticamente significativo (Tabela 3). Entretanto, considerando-se que o R^2 do ajuste quadrático foi marginalmente significativo ($F = 17,86$, g.l. = 2, $P = 0,053$), o VM e a TVM foram calculados. Suas estimativas plausíveis e de baixa variabilidade (Tabela 4) corroboraram a forma quadrática da norma de reação, embora o ajuste não tenha sido ideal (Fig. 5).

Para a razão asa:tórax, por fim, todos os R^2 foram significativos (Tabela 3). A adição do termo cúbico tornou o ajuste significativamente melhor ($F = 776,00$, g.l. = 1, $P < 0,025$), o que já não aconteceu com a adição do termo quadrático ($F = 0,52$, g.l. = 2,

$P > 0,10$). Com isso, o VM e a TMV foram calculados para a norma de reação cúbica, entretanto esse cálculo mostrou-se matematicamente impossível dentro do conjunto dos números reais por gerar uma raiz de um número negativo. Assim, rejeitou-se o ajuste cúbico assumindo-se o ajuste linear, que também gerou um R^2 alto e significativo (Tabela 3 e Fig. 5).

No Anexo (Tabela A1), encontram-se as estimativas dos parâmetros dos modelos que forneceram os melhores ajustes para as três características analisadas.

Tabela 4. Estimativa dos valores característicos das normas de reação quadráticas de tamanho da asa (Asa) e tamanho do tórax (Tórax), seguida do seu erro padrão (e.p.) e do coeficiente de variação (CV). VM: valor máximo. TVM: temperatura do valor máximo.

Valor característico		Média	e.p.	CV
Asa	VM	3,21	0,020	1,42
	TVM	16,36	0,984	13,45
Tórax	VM	1,20	0,013	2,42
	TVM	19,07	0,646	7,57

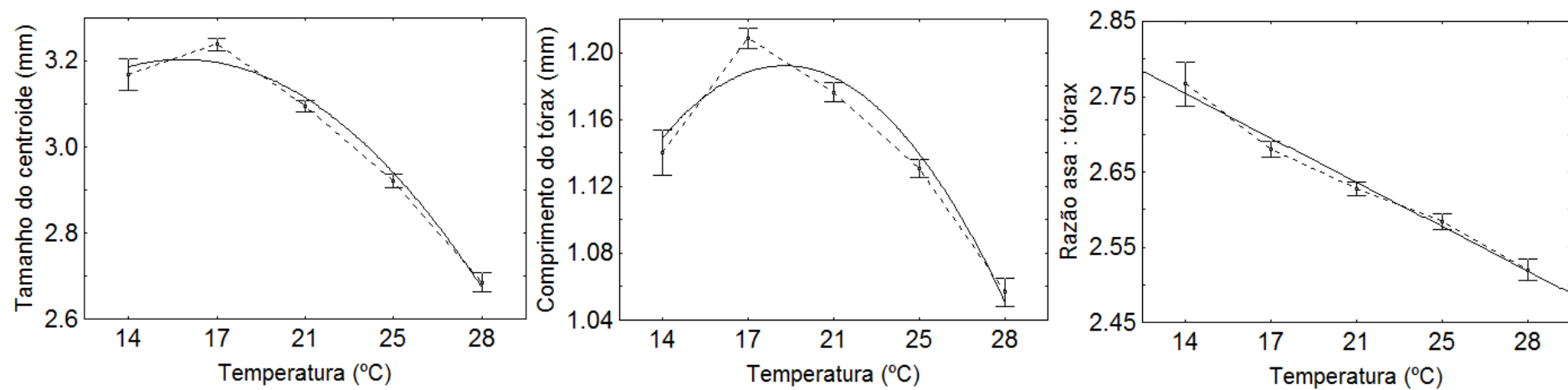


Fig. 5. Ajustes das normas de reação médias de tamanho do centroide, comprimento do tórax e razão asa:tórax pela temperatura de desenvolvimento. O modelo utilizado para tamanho do centroide e comprimento do tórax foi o quadrático e, para a razão asa:tórax, foi o linear. As curvas pontilhadas correspondem às normas de reação médias, e as curvas cheias correspondem às curvas ajustadas. As barras verticais são os intervalos de confiança de 95%.

4.2. Forma da asa

Fontes de variação

A temperatura foi a principal fonte de variação também para a forma da asa (Tabela 5). Todas as fontes de variação, contudo, mostraram-se altamente significativas, havendo, portanto, tanto influência do ambiente, quanto do genótipo e da interação entre os dois na produção das diferenças de forma da asa. Quando se analisou as ANOVAs para os dois primeiros *relative warps*, ou seja, as variáveis de forma que explicam a maior parte da variação (RW1 explica 25,69% e RW2, 19,91% da variação de forma), observou-se de modo mais claro a preponderância da temperatura como fonte de variação dos dados (Tabela 6).

Tabela 5. Análise de Variância Multivariada (MANOVA) e Análise de Covariância Multivariada (MANCOVA) realizadas com as 22 variáveis de forma da asa de *D. cardini* procedentes de diferentes linhagens e temperaturas de desenvolvimento.

	Fonte de variação	Wilk	F	g.l.	Erro g.l.	P
MANOVA	Temperatura	0,08	22,53	88	2248,5	< 0,001
	Linhagem	0,03	12,00	198	4771,4	< 0,001
	Temperatura X Linhagem	0,12	1,63	792	10799,5	< 0,001
MANCOVA	Temperatura	0,19	13,59	88	2244,6	< 0,001
	Linhagem	0,03	12,19	198	4763,0	< 0,001
	Temperatura X Linhagem	0,12	1,65	792	10780,7	< 0,001

Tabela 6. Análise de Variância para as duas primeiras variáveis de forma da asa (RW1 e RW2) de *D. cardini* procedentes de diferentes linhagens e temperaturas de desenvolvimento.

	Fonte de variação	g.l.	QM	F	P
RW1	Temperatura	4	0,0053	45,58	< 0,001
	Linhagem	9	0,0010	10,07	< 0,001
	Temperatura X Linhagem	36	0,0001	2,08	< 0,001
	Erro	589	0,0001		
RW2	Temperatura	4	0,0041	57,04	< 0,001
	Linhagem	9	0,0009	14,23	< 0,001
	Temperatura X Linhagem	36	0,0001	1,43	0,051
	Erro	589	0,0001		

Pela regressão multivariada, obteve-se um grau de variação da forma da asa associada ao componente alométrico (tamanho do centroide) de 6,44% (teste de Goodall: $F = 59,89$, $df = 22,19$, $P < 0,001$). Essa percentagem pode ser considerada baixa, mesmo porque grades de deformação mostrando a variação do componente alométrico da forma entre os espécimes localizados nos extremos opostos de tamanho da asa alteraram-se de forma quase imperceptível (resultados não apresentados).

A MANCOVA mostrou que não houve alteração em relação à MANOVA anteriormente realizada quanto à significância das fontes de variação testadas para forma da asa (Tabela 5). Além disso, a temperatura também se manteve como o fator preponderante de explicação da variação nos dados tanto na MANCOVA (Tabela 5) quanto nas ANOVAs para o RW1 e o RW2 (resultados não apresentados). O resultado do teste de Tukey realizado após a MANCOVA também não apresentou diferença em relação àquele realizado na MANOVA (resultado não apresentado).

Influência da temperatura

Traçando o gráfico dos escores do RW1 contra os do RW2 agrupados por temperatura de desenvolvimento, obteve-se ao longo do eixo das abscissas (RW1) um gradiente de 14 a 21°C em direção a escores positivos (Fig. 6). O teste de Tukey confirmou a existência de diferenças significativas ($P < 0,001$) entre todos os pares de temperaturas contrastadas com exceção de 25 e 28°C (resultados não apresentados). Também foi observado um gradiente em direção a escores positivos no eixo das ordenadas (RW2), porém menos evidente do que o obtido para o RW1 (Fig. 6). O teste de Tukey corroborou essa menor definição do gradiente do RW2, mostrando que os espécimes emergidos a 21 e a 25°C não diferiram significativamente daqueles emergidos a 28°C (resultados não apresentados).

Grades de deformação revelaram o tipo de mudança de forma associada a escores extremos das duas primeiras variáveis de forma (Fig. 6). Em relação a RW1, a mudança de forma entre escores extremos positivos e negativos esteve associada principalmente à posição de marcos anatômicos internos da asa (2, 3, 4 e 5), correspondentes à posição das veias transversais, e de marcos periféricos (6 e 9). Asas de escores mais negativos apresentaram esses marcos internos mais próximos da porção proximal da asa, enquanto que aquelas de escores mais positivos os apresentaram mais próximos da porção distal (Fig. 6). A mudança de posição dos marcos 6 e 9, por sua vez, trouxe como consequência asas de escores mais negativos ligeiramente mais arredondadas em comparação com aquelas de escores mais positivos, que se mostraram ligeiramente mais alongadas (Fig. 6). Entretanto, essa diferenciação de asas arredondadas versus asas alongadas é mais pronunciada ao longo do eixo “RW2”. Nele, a diferença de forma deu-se principalmente pela mudança de posição de marcos

anatômicos periféricos (6, 7, 8 e 9), tornando arredondadas asas de escores mais negativos e alongadas asas de escores mais positivos (Fig. 6).

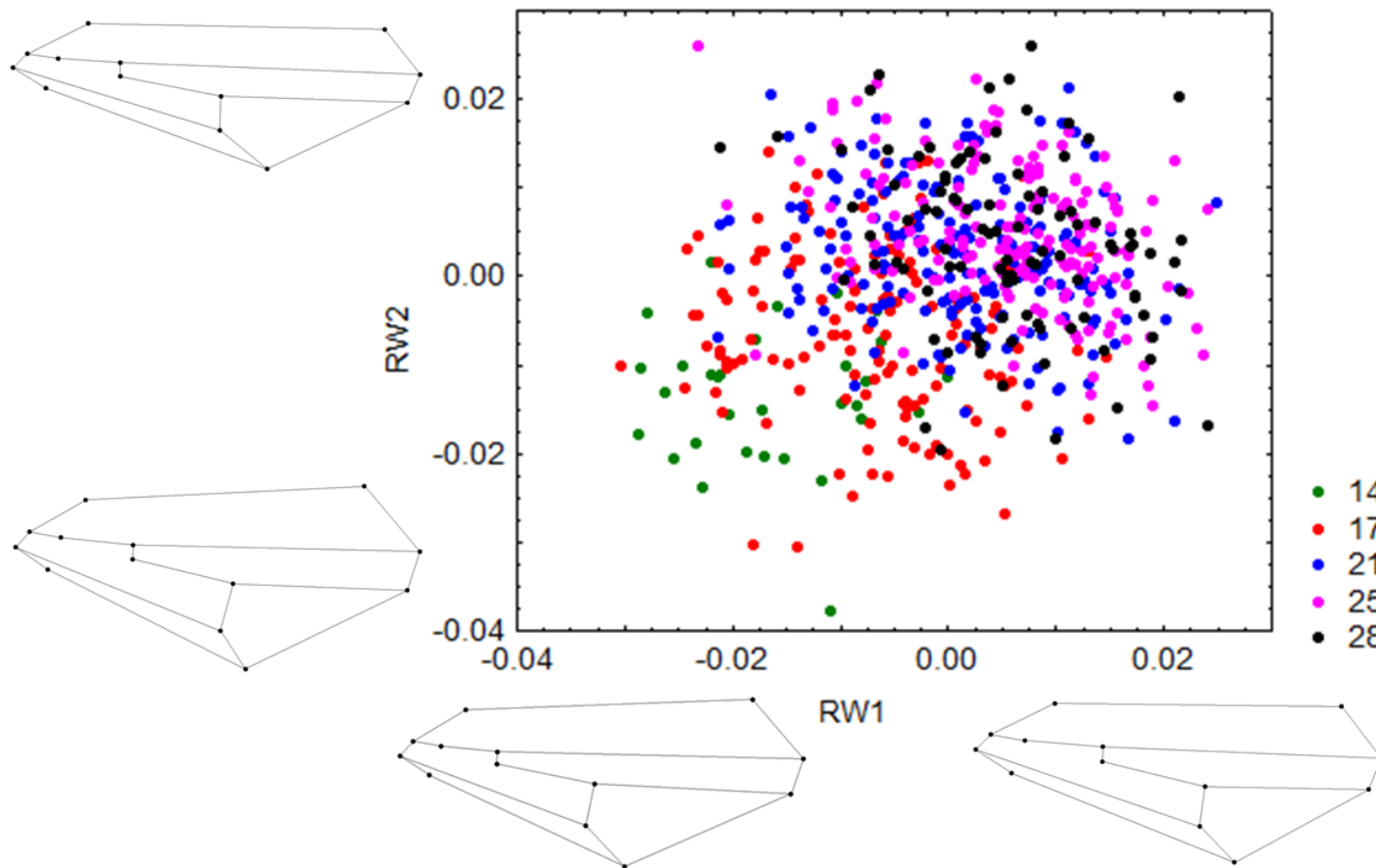


Fig. 6. Gráfico de dispersão das duas primeiras variáveis de forma da asa (RW1 e RW2). Cada ponto colorido representa um indivíduo emergido a 14°C (verde), 17°C (vermelho), 21°C (azul), 25°C (rosa) ou 28°C (preto). Ao longo dos eixos, está representada a forma típica da asa (obtida a partir de uma grade de deformação) quando escores extremos do eixo são selecionados. Os pontos dentro das asas correspondem aos marcos anatômicos previamente definidos.

4.3. Análise exploratória da variabilidade populacional

Foi detectada uma diferença significativa de variabilidade média ao longo do gradiente térmico sobre os CVs apenas para o RW1 (Tabela 7). O teste de Tukey revelou que a 25°C o CV é significativamente maior do que a 14°C ($P = 0,034$). As médias do CV do RW1 nas diferentes temperaturas de desenvolvimento estão apresentadas na Fig. 7. O ajuste quadrático dessa norma de reação foi possível, gerando um R^2 significativo de 0,980 e melhorando significativamente o ajuste aos dados ($F = 64,67$, gl = 2, $P < 0,025$). Além disso, os valores característicos foram plausíveis (VM = $2,18 \pm 0,11$ e TVM = $22,41 \pm 0,30^\circ\text{C}$).

Tabela 7. Análise de Variância para os coeficientes de variação (CVs) de tamanho do centroide (Asa - centroide), RW1 (Asa – RW1), RW2 (Asa – RW2), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão) de *D. cardini* procedentes de diferentes linhagens e temperaturas de desenvolvimento.

	Fonte de variação	g.l.	QM	<i>F</i>	<i>P</i>
Asa - centroide	Temperatura	4	2,1	1,76	0,155
	Erro	45	1,2		
Asa - RW1	Temperatura	4	5,4	2,85	0,034
	Erro	45	1,9		
Asa - RW2	Temperatura	4	1138,6	1,00	0,418
	Erro	45	1140,6		
Tórax	Temperatura	4	1,6	1,48	0,222
	Erro	55	1,1		
Razão	Temperatura	4	1,1	1,45	0,232
	Erro	45	0,8		

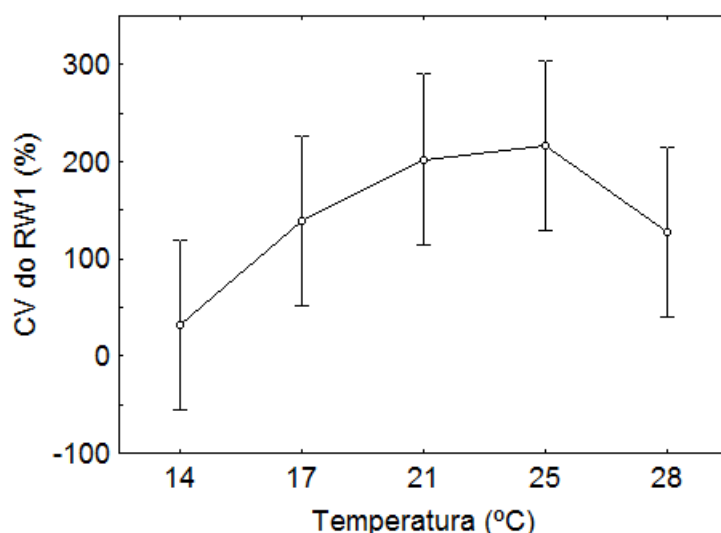


Fig. 7. Norma de reação média para o módulo do coeficiente de variação (CV) da variável de forma da asa mais explicativa (RW1) pela temperatura de desenvolvimento. As barras verticais são os intervalos de confiança de 95%.

Das dez linhagens que tiveram o tamanho da asa estimado e analisado, foi possível ajustar a norma de reação do CV de apenas três (Tabela 8). Nas demais, o ajuste não foi possível por se tratarem de normas de reação de grau superior ao cúbico ou simplesmente por serem estas normas não responsivas à temperatura.

Nas linhagens 14 e 22, o modelo que melhor se ajustou aos dados foi o linear, com valores de R^2 relativamente altos (Tabela 8, Figs. 8A e 8C). No primeiro caso, o valor do R^2 gerado pelo ajuste quadrático (um valor também significativo – Tabela 8) não foi significativamente maior do que aquele gerado pelo modelo linear ($F = 13,80$, g.l. = 2, $0,05 < P < 0,10$). Na linhagem 21, o único modelo que apresentou um R^2 significativo (ainda que marginalmente: $F = 183,82$, g.l. = 3, $P = 0,054$) foi o cúbico, melhorando significativamente o ajuste aos dados ($F = 199,75$, g.l. = 1, $P < 0,05$). Assim, após os valores característicos da norma de reação cúbica terem sido calculados e se mostrado plausíveis (Tabela 9), o ajuste foi utilizado (Fig. 8B).

Para o RW1, não foi possível ajustar a norma de reação de nenhuma linhagem. Já para o RW2, foram ajustadas as normas de reação das linhagens 15 (modelo linear, $R^2 = 0,846$) e 21 (modelo quadrático, $R^2 = 0,983$). Para esta última linhagem, o modelo quadrático melhorou significativamente o ajuste aos dados em relação ao linear ($F = 59,43$, g.l. = 2, $P < 0,025$), e os valores característicos foram plausíveis (resultados não apresentados).

Para o tamanho do tórax, foram ajustadas as normas de reação do CV de duas das 12 linhagens analisadas (Tabela 8). Na linhagem 12, o único modelo com R^2 significativo e relativamente alto foi o linear (Tabela 8, Fig. 9A), e na linhagem 21 foi o cúbico (Tabela 8), o qual melhorou significativamente o ajuste aos dados ($F = 2564,37$, g.l. = 1, $P < 0,025$). O ajuste para esta última linhagem foi então efetuado após verificação da plausibilidade dos valores característicos (Tabela 9, Fig. 9B).

Para a razão asa:tórax, o ajuste a princípio não seria possível para nenhuma das dez linhagens analisadas, entretanto, o modelo quadrático forneceu um R^2 alto (tabela 8) e marginalmente significativo para a norma de reação do CV da linhagem 9 ($F = 17,24$, g.l. = 2, $P = 0,055$). Além disso, esse modelo também melhorou significativamente o ajuste aos dados ($F = 33,63$, g.l. = 2, $P < 0,05$). Quando os valores característicos da norma de reação quadrática foram estimados, entretanto, obtiveram-se valores absurdos (Tabela 9), inviabilizando o ajuste.

No Anexo (Tabelas A2 e A3), encontram-se os valores de CV para todas as características analisadas e as estimativas dos parâmetros dos modelos que forneceram os melhores ajustes para os CVs dos tamanhos da asa e do tórax.

Tabela 8. Coeficientes de determinação (R^2) resultantes do ajuste de três modelos (linear, quadrático e cúbico) aos dados de coeficiente de variação (CV) de tamanho da asa (Asa), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão) de diferentes linhagens nas diferentes temperaturas de desenvolvimento.

		R^2		
	Linhagem	Modelo linear	Modelo quadrático	Modelo cúbico
Asa	14	0,788*	0,973*	0,980
	21	0,146	0,637	0,998
	22	0,791*	0,846	0,941
Tórax	12	0,832*	0,834	0,984
	21	0,385	0,509	0,999*
Razão	9	0,023	0,945	0,947

* < 0,05

Tabela 9. Estimativa dos valores característicos das normas de reação cúbicas dos coeficientes de variação (CVs) do tamanho da asa (Asa) e do tamanho do tórax (Tórax) da linhagem 21 e da norma de reação quadrática do CV da razão asa:tórax (Razão) da linhagem 9. VM: valor máximo. TVM: temperatura do valor máximo.

	Linhagem	Ajuste	Valor característico	Média
Asa	21	Cúbico	VM	2,54
			TVM	18,87
Tórax	21	Cúbico	VM	2,38
			TVM	18,49
Razão	9	Quadrático	VM	-48,05
			TVM	-3530,62

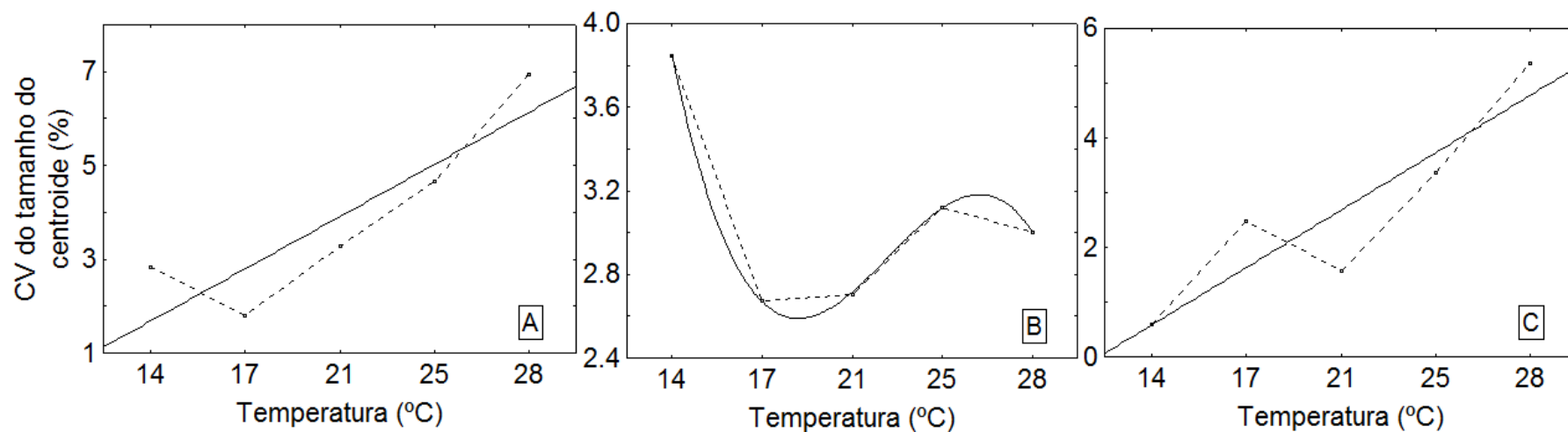


Fig. 8. Ajustes das normas de reação do coeficiente de variação (CV) do tamanho do centroide (mm) das linhagens 14 (A), 21 (B) e 22 (C) pela temperatura de desenvolvimento. O modelo utilizado em A e C foi o linear e, em B, foi o cúbico. As curvas pontilhadas correspondem às normas de reação, e as curvas cheias correspondem às curvas ajustadas.

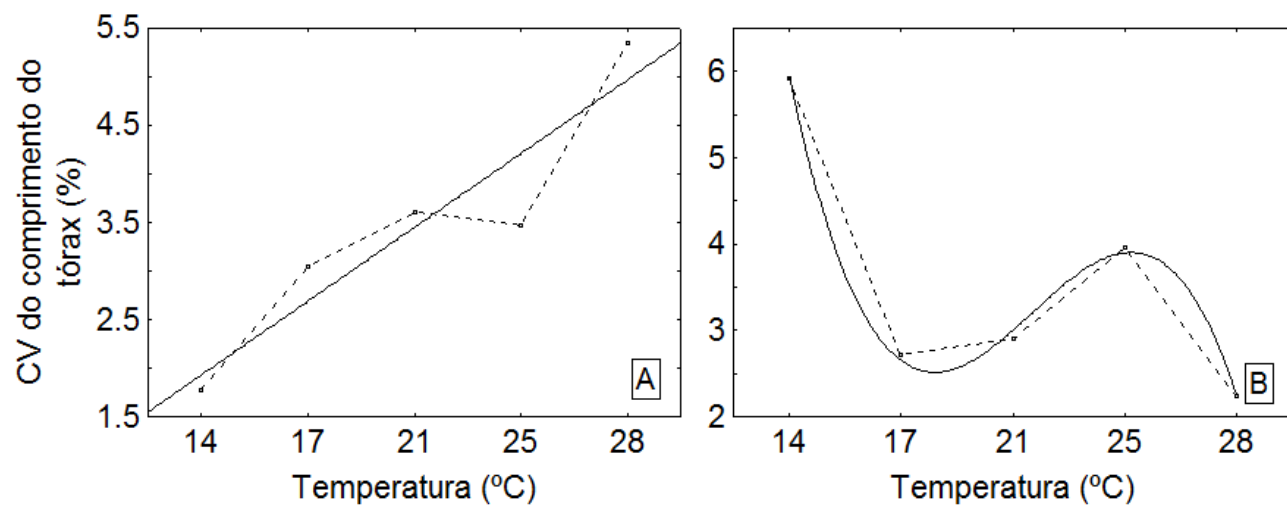


Fig. 9. Ajustes das normas de reação do coeficiente de variação (CV) do comprimento do tórax (mm) das linhagens 12 (A) e 21 (B) pela temperatura de desenvolvimento. Os modelos utilizados em A e B foram, respectivamente, o linear e o cúbico. As curvas pontilhadas correspondem às normas de reação, e as curvas cheias correspondem às curvas ajustadas.

5. Discussão

A maior parte dos estudos de plasticidade de características morfológicas em relação à temperatura de desenvolvimento realizados com drosofilídeos utiliza espécies do grupo *D. melanogaster*, do subgênero *Sophophora* de *Drosophila* (Karan *et al.* 1999a, Powell *et al.* 2010). Se restringirmos os estudos acima mencionados àqueles que descrevem a forma das normas de reação obtidas, o número daqueles utilizando espécies fora do grupo *D. melanogaster* pode ser contado nos dedos (ex. Thomas 1993, Karan *et al.* 1999a, Loh *et al.* 2008, Rocha *et al.* 2009). Isso, aliado ao fato de que, apenas dentro do gênero *Drosophila*, há mais de 2.000 espécies conhecidas e que apresentam grande diversidade ecológica (Powell 1997), torna urgentes estudos detalhados de plasticidade com espécies pertencentes a diferentes grupos do gênero. O “paradigma *Drosophila*”, termo utilizado por David *et al.* (2004) para se referir aos estudos com o gênero *Drosophila* como um referencial na investigação de plasticidade fenotípica, carece de diversificação das espécies-modelo utilizadas.

Em vista disso, o presente trabalho contribui com dados sobre a forma de normas de reação, em resposta à temperatura de desenvolvimento, de características morfológicas de *Drosophila cardini*, uma espécie Neotropical pertencente ao grupo *D. cardini* do subgênero *Drosophila*. Além disso, este trabalho também traz informações detalhadas sobre a variação de forma da asa dessa espécie em resposta à variação na temperatura de desenvolvimento. Essa análise também é de interesse, já que padrões para esse tipo de resposta plástica no gênero ainda não foram estabelecidos (Loh *et al.* 2008, Pitchers *et al.* 2012).

Tamanhos da asa e do tórax em resposta à temperatura de desenvolvimento

As normas de reação médias dos tamanhos da asa, do tórax e da razão entre eles responderam plasticamente ao gradiente térmico. Powell *et al.* (2010) ao analisarem a plasticidade fenotípica de comprimento da asa de seis espécies de *Drosophila* (representantes das regiões tropical e temperada), afirmaram que a resposta fenotípica à temperatura parece ser uma característica bem conservada no gênero *Drosophila*, o que foi corroborado no presente estudo. Apesar de todas as características terem respondido à variação de temperatura, essa resposta, entretanto, não foi igual entre elas.

Tanto o tamanho da asa quanto o do tórax apresentaram normas de reação quadráticas, mas a temperatura do valor máximo foi cerca de três graus Celsius menor para a asa. Já a norma de reação da razão asa:tórax foi linear.

Normas de reação quadráticas para tamanho do tórax não são novidade entre espécies de *Drosophila* (Moreteau *et al.* 1997, Morin *et al.* 1997, Morin *et al.* 1999, David *et al.* 2006). No caso de *D. cardini*, é possível visualizar graficamente que o ajuste não foi ideal (Fig. 5), principalmente em função do decréscimo brusco do valor da característica entre 17 e 14°C. Tal decréscimo brusco para o tamanho do tórax a baixa temperatura também foi observado para a espécie circuntropical *Drosophila ananassae* (Morin *et al.* 1997), que apresenta alta mortalidade a 16°C e não se desenvolve a 15°C (Morin *et al.* 1997, David *et al.* 2004, Yadav & Singh 2005). *D. cardini* apresentou baixíssima eclosão de adultos a 14°C e, possivelmente, sequer se desenvolveria até o estágio adulto a uma temperatura menor. Para uma melhor descrição da norma de reação de tamanho do tórax de *D. cardini*, é provável ser necessário introduzir uma temperatura entre 17 e 14°C e eliminar o tratamento térmico de 14°C, já que essa temperatura parece já ser de extremo estresse para a espécie, gerando, assim,

resultados muito discrepantes resultantes de efeitos deletérios (Ayrinhac *et al.* 2004, David *et al.* 2006).

Já as normas de reação do tamanho da asa de *Drosophila* costumam variar na literatura entre as formas quadrática (Moreteau *et al.* 1997, Morin *et al.* 1997, Haerty *et al.* 2003) e cúbica (Karan *et al.* 1999b, Morin *et al.* 1999, David *et al.* 2006). A temperatura mais baixa para o valor máximo do tamanho da asa em relação àquela obtida para o do tórax já é bem estabelecida (Karan *et al.* 1999a, David *et al.* 2006), sendo observada até mesmo na espécie de drosofilídeo *Zaprionus indianus* (Karan *et al.* 1999a). De uma maneira geral, acredita-se que a temperatura do valor máximo represente a condição fisiológica ótima da população analisada (Stearns 1992, Charnov 1993, Roff 1997, David *et al.* 2006), mas observações de características de uma mesma população apresentando temperaturas do valor máximo diferentes enfraquecem essa interpretação (Morin *et al.* 1997, Karan *et al.* 1999a, David *et al.* 2004).

A razão da discrepância entre as temperaturas que proporcionam tamanhos máximos de asa e de tórax não é bem compreendida. Entretanto, há uma hipótese – proposta inicialmente no contexto de variações genéticas sazonais (Stalker 1980), e posteriormente estendida ao contexto da plasticidade fenotípica (Pétavy *et al.* 1997) – que tem sido bem suportada por evidências indiretas (Starmer & Wolf 1989, Karan *et al.* 1999a, Morin *et al.* 1999, Norry *et al.* 2001, Carreira *et al.* 2006, Hoffmann *et al.* 2007, Frazier *et al.* 2008, Liefting *et al.* 2009). Essa hipótese baseia-se na observação de que a razão asa:tórax decresce de forma aproximadamente linear com o aumento da temperatura de desenvolvimento (Karan *et al.* 1999a, Haerty *et al.* 2003, David *et al.* 2006, Chakir *et al.* 2011), fato também observado no presente trabalho. Desse modo, esse decréscimo da razão asa:tórax seria acompanhado por um aumento linear na carga alar, o que dificultaria o voo se não fosse pelo aumento de batimentos das asas das

moscas a temperaturas mais altas (uma possível consequência de maior eficiência muscular – David *et al.* 1994). Em temperaturas mais baixas, portanto, a carga alar seria menor (já que a razão asa:tórax é maior), o que favoreceria o voo, e a frequência de batimento das asas seria também menor. Com isso, a razão asa:tórax estaria diretamente ligada à capacidade de voo e poderia ser o verdadeiro alvo da seleção natural (Pétavy *et al.* 1997). As asas aumentariam de tamanho a baixas temperaturas não simplesmente porque é adaptativo ter asas maiores nessas condições, mas sim porque ter baixa carga alar, isto é, ter uma elevada razão asa:tórax é adaptativo no frio.

Um dos principais interesses em se estudar a forma de normas de reação é observar como a norma em si pode ser moldada por seleção natural e poder identificar, assim, possíveis alvos de seleção dentro de uma população (David *et al.* 1997, Gibert *et al.* 1998, Rocha & Klaczko 2012). Observações interessantes, que mostram como a norma de reação pode ser moldada de acordo com a adaptação térmica, emergiram de comparações de populações de diferentes latitudes (ex. Morin *et al.* 1999, Loh *et al.* 2008) e de comparações entre espécies tropicais e de região temperada (ex. Moreteau *et al.* 1997, Morin *et al.* 1997, Karan *et al.* 1999a). Nesses casos, a diferença nas normas de reação foi detectada pela diferença nas temperaturas do valor máximo. Populações adaptadas a clima quente apresentavam temperatura de valor máximo mais alta em relação àquela apresentada pelas populações de clima mais ameno.

D. cardini apresentou $16,36 \pm 0,98^{\circ}\text{C}$ e $19,07 \pm 0,65^{\circ}\text{C}$ de temperatura do valor máximo para tamanho da asa e tamanho do tórax, respectivamente. Essa espécie é coletada em maior abundância na Reserva Ecológica do IBGE, de onde proveio a população aqui estudada, nos meses de fevereiro a abril (Roque *et al.* 2013), nos quais as temperaturas mínimas são de cerca de 16°C e as máximas de cerca de 28°C . Em abril, mês em que foi amostrada a população no presente estudo, a temperatura mínima

encontrada é de cerca de 15°C e a máxima de cerca de 27°C. Logo, parece que as temperaturas do valor máximo obtidas para *D. cardini* estão coerentes com as condições térmicas encontradas na região de coleta. Devido ao fato de as temperaturas obtidas pela estação meteorológica da reserva ecológica possivelmente não corresponderem exatamente às encontradas pelas larvas de drosofilídeos dentro dos frutos (nos quais deve haver menor variação térmica), é possível que a redução da temperatura mínima no Cerrado no mês de maio (início da estação seca) não afete bruscamente o desenvolvimento de *D. cardini*. Entretanto, a variação dos recursos no Cerrado entre as estações chuvosa e seca é o que parece explicar de fato a dinâmica populacional dos drosofilídeos desse bioma (Döge 2013, Valadão 2013). Portanto, mesmo havendo condições térmicas ainda favoráveis à população de *D. cardini* e de outras populações de drosofilídeos, ocorre drástico afunilamento delas na seca no Cerrado, e isso parece ser explicado pela escassez de recursos nessa estação (Döge 2013, Valadão 2013).

Com relação à tolerância térmica de *D. cardini*, mais estudos são necessários para melhor definição da amplitude térmica viável da espécie, incorporando, por exemplo, o teste de viabilidade de desenvolvimento a adulto nos tratamentos de 13 e 29°C, temperaturas candidatas a extremos da amplitude. Mais populações, de diferentes localidades, também devem ser amostradas e analisadas.

Tamanhos da asa e do tórax em resposta a outras fontes de variação

Além da temperatura, o fator de interação temperatura X linhagem também é interessante porque, quando significativo, ele indica que há variação genética para as repostas representadas pelas normas de reação e que, portanto, estas podem evoluir (Pigliucci 2001). Tanto para o tamanho da asa quanto para o do tórax, esse fator foi

significativo, já, para a razão asa:tórax, não. Logo, a forma da norma de reação dessa razão parece estar fixa na população, podendo essas curvas estarem sujeitas a seleção estabilizadora (Noach *et al.* 1996, Kingsolver & Pfennig 2007).

Forma da asa em resposta à temperatura de desenvolvimento

A forma da asa de *D. cardini* também respondeu à variação na temperatura de desenvolvimento, e esse efeito foi responsável pela maior parte da variação nos dados de forma. O efeito da temperatura na variação de forma da asa de *Drosophila*, assim como ocorre com o tamanho, já é um padrão esperado (Moreteau *et al.* 1998, Debat *et al.* 2003, Matta & Bitner-Mathé 2004, Debat *et al.* 2008, Loh *et al.* 2008, Debat *et al.* 2009, Pitchers *et al.* 2012). Entretanto, nem sempre o foi, tanto que alguns índices da asa definidos por Sturtevant (1942) são comuns em chaves de identificação de espécies de drosofilídeos amplamente utilizadas até hoje.

O agrupamento dos indivíduos emergidos nas diferentes temperaturas formou um gradiente ao longo dos dois eixos do gráfico de dispersão. Nos espécimes emergidos a baixas temperaturas, as asas foram mais arredondadas e, nos de temperaturas mais altas, elas foram mais alongadas, corroborando o padrão já encontrado em *D. melanogaster* por Debat *et al.* (2009). Além disso, ao longo do eixo referente à variável de forma mais explicativa (RW1), houve uma movimentação das veias transversais em direção à porção mais proximal da asa nas temperaturas mais frias, e em direção à porção mais distal da asa nas temperaturas mais quentes. Esse padrão, por sua vez, ocorreu de forma contrária em Debat *et al.* (2009), isto é, nos espécimes emergidos a 28°C as veias transversais foram mais proximais em relação àquelas dos espécimes de 18°C. Curiosamente, Debat *et al.* (2009) também observaram uma movimentação em

sentido diferente dos marcos anatômicos equivalentes aos marcos 4 e 5 do presente trabalho que fazia com que a veia transversal posterior ficasse oblíqua em sentidos diferentes nos dois extremos do eixo de variação da forma. Essa variação também foi aqui observada ao longo do eixo referente à segunda variável de forma mais explicativa (RW2), estando oblíqua para a direita nas temperaturas mais baixas e para a esquerda nas mais altas.

É interessante que as variações de forma aqui observadas tenham sido comparáveis àquelas observadas em Debat *et al.* (2009), pois esses autores analisaram uma amostra mista de machos de *D. melanogaster*, envolvendo tipos selvagens e mutantes relacionados ao desenvolvimento da asa. Fato é que o efeito da temperatura foi preponderante na explicação dos dados de forma da asa desse trabalho e, além disso, as linhagens analisadas no presente estudo corresponderam à terceira geração nascida em laboratório, então efeitos de perda de heterozigosidade, que poderia expor eventuais mutações deletérias, são bastante improváveis. Essa hipótese de perda de heterozigosidade também se enfraquece pela observação de que uma geração heterozigota de *Drosophila mercatorum* apresentou asas mais estreitas a altas temperaturas (mesmo padrão aqui observado) em contraposição à geração parental homozigota, que apresentou asas mais largas nessas temperaturas (Krag *et al.* 2009). Além disso, Pitchers *et al.* (2012), trabalhando com populações naturais de *D. melanogaster*, também observaram variação predominante na posição das veias transversais ao longo do eixo horizontal em resposta à temperatura de desenvolvimento. Esse padrão foi observado tanto no laboratório quanto em um gradiente de altitude (Pitchers *et al.* 2012).

Resultados divergentes aos aqui apresentados, isto é, com asas de moscas emergidas a alta temperatura arredondadas e asas de moscas de baixa temperatura

alongadas, estão presentes em quantidade na literatura (Azevedo *et al.* 1998, Loeschcke *et al.* 2000, Hoffmann & Shirriffs 2002, Matta & Bitner-Mathé 2004, Loh *et al.* 2008). Essa falta de consenso na área parece ser um reflexo do fato de variações na forma das asas serem mais difíceis de interpretar por três razões principais. A primeira está relacionada com a maior regulação gênica existente sobre a forma da asa de *Drosophila* em relação àquela existente sobre o seu tamanho (Birdsall *et al.* 2000), tornando, assim, a resposta da forma da asa à variação ambiental mais complexa. A segunda razão, por sua vez, está relacionada à diversidade de técnicas que têm sido utilizadas para esse tipo de análise (ex. Cavicchi *et al.* 1985, Moreteau *et al.* 1998, Bitner-Mathé & Klaczko 1999, Imasheva *et al.* 2000, Debat *et al.* 2003). Tendo em vista que os pressupostos das diferentes técnicas variam, assim como a visualização da variação de forma que é possível com cada uma (Zelditch *et al.* 2004), comparações entre trabalhos nem sempre são possíveis. A terceira razão, por fim, diz respeito à escassez de conhecimento sobre a influência da forma da asa na capacidade de voo e atração das fêmeas de *Drosophila* pelos machos, características diretamente associadas ao valor adaptativo das moscas (Debat *et al.* 2009, Menezes *et al.* 2013).

Sabe-se, entretanto, que asas mais alongadas parecem estar relacionadas com maior velocidade de voo em insetos (Snodgrass 1993), inclusive por promoverem maior velocidade de translação das extremidades das asas gerando, assim, maior força aerodinâmica (Pennycuick 1968, Ellington 1984). Além disso, veias transversais nas asas dos insetos têm a principal função de estabilizá-las (Wootton 1992). Portanto, é possível que asas alongadas com veias transversais deslocadas para a sua porção mais distal sejam vantajosas no desempenho em voos rápidos. Como *D. cardini* é uma espécie identificada como sendo típica de áreas abertas (Vilela *et al.* 2002, Mata 2007), evolutivamente faz sentido que a população analisada apresente asas com as

características anteriormente descritas (que foram observadas no presente estudo) naquelas temperaturas que são mais frequentemente encontradas em seu habitat, isto é, nas temperaturas mais altas. E, nas temperaturas mais baixas, como seriam encontradas apenas raramente (principalmente porque *D. cardini* é bem pouco coletada no inverno no Cerrado – Tidon 2006, Roque *et al.* 2013), os indivíduos dessa população não teriam tido ocasião de serem selecionados para um melhor desempenho de voo. Entretanto, essas são apenas especulações que precisam ser rigorosamente investigadas.

Variabilidade em resposta à temperatura de desenvolvimento

Uma das vantagens de se adotar a técnica de isolinhagens para uma análise de plasticidade fenotípica está na possibilidade de se obter informações a respeito da origem da variabilidade presente nos dados, já que ela permite separar o efeito do ambiente do efeito do genótipo (David *et al.* 2005).

Com exceção da primeira variável de forma da asa (RW1), nenhuma outra característica analisada apresentou variabilidade média diferencial entre as temperaturas experimentais. Curiosamente RW1 apresentou uma norma de reação para o coeficiente de variação (CV) côncava, apresentando diferença significativa de variabilidade entre as temperaturas de 14 e 25°C. A variabilidade mostrou-se menor a 14°C, uma temperatura que pôde ser considerada estressante para *D. cardini*, e maior a 25°C (mais propriamente a 22,4°C pelo ajuste polinomial), temperatura na qual houve elevada emergência de adultos. Essa observação foi consistente com o espalhamento dos pontos referentes aos indivíduos emergidos a cada uma dessas temperaturas no gráfico de dispersão.

A maioria dos estudos com *Drosophila* apresenta normas de reação médias do CV pela temperatura de desenvolvimento aproximadamente convexas, isto é, com menor variabilidade nas temperaturas ótimas e maior variabilidade nas estressantes (ex. David *et al.* 1994, Imasheva *et al.* 2000, David *et al.* 2006). Entretanto, Kjærsgaard *et al.* (2007) observaram menores distâncias de Mahalanobis para forma da asa entre indivíduos de *D. mercatorum* emergidos a 28°C em comparação com aquelas obtidas para os emergidos a 25°C. Ou seja, os indivíduos de 28°C tiveram asas de forma mais semelhante entre si em relação àqueles de 25°C. Os autores interpretaram esse resultado sugerindo que fenótipos extremos (relacionados à forma da asa) estariam sujeitos a maior mortalidade a 28°C, já que havia sido observada menor sobrevivência de pupas nessa temperatura (Kjærsgaard *et al.* 2007). Vale ressaltar que o estudo de Kjærsgaard *et al.* (2007) utilizou a técnica de morfometria geométrica, enquanto que o estudo de Imasheva *et al.* (2000) (citado acima) foi realizado com morfometria tradicional, isto é, que não separa os efeitos do tamanho daqueles da forma (Zelditch *et al.* 2004). Assim, novamente a utilização de diferentes técnicas para medição de forma dificulta comparações entre dados.

Em favor da interpretação de Kjærsgaard *et al.* (2007), há uma nova linha de pesquisa na área de Ecologia de comunidades que pretende explicar padrões de composição de espécies partindo do nível intraespecífico de variação (Violle *et al.* 2012). Assim, essa linha de pesquisa parte do pressuposto de que, nos diferentes habitats, há valores ótimos de caracteres específicos e que, devido a isso, existe um filtro selecionando indivíduos com valores aproximados àqueles ótimos (ideia semelhante à da seleção estabilizadora) (Violle *et al.* 2012). Condições estressantes, como altas ou baixas temperaturas, poderiam ser filtros como os acima propostos, reduzindo a variação observada ao selecionar apenas os indivíduos com determinada

forma da asa, já que este parece ser um caractere adaptativo (Frazier *et al.* 2008, Menezes *et al.* 2013). Entretanto, mais estudos são necessários analisando a variação de dados de forma da asa em relação a um amplo gradiente de tratamentos para melhor elucidação da influência de condições estressantes. Além disso, cautela na interpretação dos dados de variação aqui gerados faz-se necessária, já que os padrões observados podem ser um simples artifício do baixo número amostral a 14°C.

Variabilidade diferencial entre as linhagens ao longo do gradiente térmico, por sua vez, foi observada para os tamanhos da asa e do tórax e para RW2 pelo ajuste diferencial da norma de reação de algumas linhagens. Para as outras características (razão asa:tórax e RW1), essa variabilidade não pôde ser detectada pelo método aqui adotado, mas isso não significa que ela, de fato, não exista. É interessante observar a variação de resposta do CV à temperatura entre as linhagens para as quais essas normas de reação puderam ser ajustadas. Enquanto a linhagem 21 apresentou variabilidade máxima a 14°C tanto para o tamanho da asa quanto para o do tórax, as demais linhagens apresentaram variabilidade mínima a essa temperatura. Essa ampla variação entre linhagens é congruente com a não observação de diferença de variabilidade média entre as temperaturas de desenvolvimento para essas características, já que as curvas tão diferentes das linhagens analisadas devem se anular, gerando uma norma de reação média de CV não responsiva. Um padrão no CV médio pela temperatura de desenvolvimento também não foi encontrado para os comprimentos da asa e do tórax de fêmeas de *D. melanogaster* coletadas na Tanzânia (Noach *et al.* 1996).

6. Conclusão

Foi observada plasticidade fenotípica para todas as características analisadas de *D. cardini*, sendo ela responsável por explicar a maior parte da variação em todos os casos. As normas de reação geradas para as características de tamanho e para a razão asa:tórax tiveram forma já prevista a partir de análises presentes na literatura com outras espécies, sendo quadráticas para tamanho da asa e tamanho do tórax e linear monotonamente decrescente para a razão dessas duas medidas. Além disso, as temperaturas do valor máximo obtidas para as normas de reação dos tamanhos da asa e do tórax de *D. cardini* foram coerentes com a amplitude térmica encontrada no local de coleta da população dentro dos meses referentes ao seu pico populacional. Moscas emergidas a alta temperatura, em comparação com as de baixa temperatura, apresentaram asas de morfologia aparentemente mais propícia a um melhor desempenho de voo. E, por fim, observou-se maior variabilidade média para forma da asa na temperatura estressante de 14°C e menor variabilidade a 25°C, uma temperatura mais próxima ao ótimo da população analisada. Estes últimos resultados devem, contudo, ser vistos com cautela em razão do número amostral envolvido.

Mais estudos de plasticidade fenotípica envolvendo espécies de *Drosophila* de ecologia diversa são necessários, aproveitando as facilidades oferecidas por esse organismo-modelo para gerar evidências sobre como se dá a ação desse fenômeno na natureza. Além disso, a forma da asa dessas moscas precisa ser mais bem investigada na sua relação com o desempenho de voo (uma característica que é apontada como sendo alvo de seleção natural em diferentes contextos) e na sua variabilidade ao longo de gradientes ambientais.

7. Referências bibliográficas

- Ayrinhac, A., V. Debat, P. Gibert, A.-G. Kister, H. Legout, B. Moreteau, R. Vergilino & J. R. David. 2004. Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: phenotypic plasticity is more important than genetic variability. *Functional Ecology* 18: 700-706.
- Azevedo, R. B. R., A. C. James, J. McCabe & L. Partridge. 1998. Latitudinal Variation of Wing: Thorax Size Ratio and Wing-Aspect Ratio in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 52: 1353-1362.
- Birdsall, K., E. Zimmerman, K. Teeter & G. Gibson. 2000. Genetic variation for the positioning of wing veins in *Drosophila melanogaster*. *Evolution and Development* 2: 16-24.
- Bitner-Mathé, B. C. & L. B. Klaczko. 1999. Plasticity of *Drosophila melanogaster* wing morphology: effects of sex, temperature and density. *Genetica* 105: 203-210.
- Bookstein, F. L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press.
- Brake, I. & G. Bächli. 2008. *World Catalogue of Insects, Vol.9, Drosophilidae (Diptera)*. Appolo Books, Stenstrup, DK.
- Brisson, J. A., J. Wilder & H. Hollocher. 2006. Phylogenetic Analysis of the *cardini* Group of *Drosophila* with Respect to Changes in Pigmentation. *Evolution* 60: 1228-1241.
- Bubliy, O. A., K. S. Tcheslavskaya, A. M. Kolikov, O. E. Lazebny & V. G. Mitrofanov. 2008. Variation of wing shape in the *Drosophila virilis* species group (Diptera:Drosophilidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 46: 38-47.
- Carreira, V. P., I. M. Soto, E. Hasson & J. J. Fanara. 2006. Patterns of variation in wing morphology in the cactophilic *Drosophila buzzatii* and its sibling *D. koepferae*. *J. Evol. Biol.* 19: 1275-1282.
- Cavicchi, S., D. Guerra, G. Giorgi & C. Pezzoli. 1985. Temperature-related divergence in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. I. Genetic and developmental basis of wing size and shape variation. *Genetics* 109: 665-689.
- Chakir, M., H. Negoua, P. Capy & J. R. David. 2011. Phenotypic variability and sex dimorphism in *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae): comparison of wild and laboratory grown adults of two sympatric cosmopolitan species. *Ann. Soc. entomol. Fr. (N.S.)* 47: 371-383.
- Charnov, E. L. 1993. *Life History Invariants*. Oxford University Press, Oxford.
- Danchin, E. 2013. Avatars of information: towards an inclusive evolutionary synthesis. *Trends Ecol. Evol.* 28: 351-358.
- David, J. R. & P. Capy. 1988. Genetic variation of *Drosophila melanogaster* natural populations. *Trends Genet.* 4: 106-111.
- David, J. R., P. Gibert & B. Moreteau. 2004. Evolution of Reaction Norms. In T. J. DeWitt & S. M. Scheiner [eds.], *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches*. Oxford University Press, Nova Iorque.
- David, J. R., H. Legout & B. Moreteau. 2006. Phenotypic plasticity of body size in a temperate population of *Drosophila melanogaster*: when the temperature-size rule does not apply. *Journal of Genetics* 85: 9-23.
- David, J. R., B. Moreteau, J. P. Gauthier, G. Pétavy, A. Stockel & A. G. Imasheva. 1994. Reaction norms of size characters in relation to growth temperature in

- Drosophila melanogaster*: an isofemale lines analysis. Genet. Sel. Evol. 26: 229-251.
- David, J. R., P. Gibert, H. Legout, G. Pétavy, P. Capy & B. Moreteau. 2005.** Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. Heredity 94: 3-12.
- David, J. R., P. Gibert, E. Gravot, G. Pétavy, J. P. Morin, D. Karan & B. Moreteau. 1997.** Phenotypic plasticity and developmental temperature in *Drosophila*: analysis and significance of reaction norms of morphometrical traits. J. therm. Biol. 22: 441-451.
- Debat, V., A. Debelle & I. Dworkin. 2009.** Plasticity, canalization, and developmental stability of the *Drosophila* wing: joint effects of mutations and developmental temperature. Evolution 63: 2864-2876.
- Debat, V., M. Bégin, H. Legout & J. R. David. 2003.** Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. Evolution 57: 2773-2784.
- Debat, V., R. Cornette, A. B. Korol, E. Nevo, D. Soulet & J. R. David. 2008.** Multidimensional analysis of *Drosophila* wing variation in Evolution Canyon. Journal of Genetics 87: 407-419.
- Döge, J. S. 2013.** O Sucesso de Invasão de Drosofilídeos no Cerrado, uma Abordagem Entrópica., pp. 148, Departamento de Ecologia. Universidade de Brasília, Brasília.
- Dryden, I. L. & K. V. Mardia. 1998.** Statistical Shape Analysis. Wiley, Chichester.
- Ellington, C. P. 1984.** The aerodynamics of hovering insect flight. II. Morphological parameters. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 305: 17-40.
- Frazier, M. R., J. F. Harrison, S. D. Kirkton & S. P. Roberts. 2008.** Cold rearing improves cold-flight performance in *Drosophila* via changes in wing morphology. The Journal of Experimental Biology 211: 2116-2122.
- Freire-Maia, N. & C. Pavan. 1949.** Introdução ao estudo da Drosófila. Cultus 1: 1-71.
- Futuyma, D. J. 2011.** Expand or revise? The evolutionary synthesis today. Quart. Rev. Biol. 86: 203-208.
- Gianoli, E. & F. Valladares. 2012.** Studying phenotypic plasticity: the advantages of a broad approach. Biological Journal of the Linnean Society 105: 1-7.
- Gibert, P., B. Moreteau, J. R. David & S. M. Scheiner. 1998.** Describing the Evolution of Reaction Norm Shape: Body Pigmentation in *Drosophila*. Evolution 52: 1501-1506.
- Gilchrist, A. S. & R. B. Huey. 2004.** Plastic and Genetic Variation in Wing Loading as a Function of Temperature Within and Among Parallel Clines in *Drosophila subobscura*. Integrative and Comparative Biology 44: 461-470.
- Gould, S. J. 2002.** The Structure of Evolutionary Theory. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Haerty, W., P. Gibert, P. Capy, B. Moreteau & J. R. David. 2003.** Microspatial structure of *Drosophila melanogaster* populations in Brazzaville: evidence of natural selection acting on morphometrical traits. Heredity 91: 440-447.
- Hoffmann, A. A. & J. Shirriffs. 2002.** Geographic variation for wing shape in *Drosophila serrata*. Evolution 56: 1068-1073.
- Hoffmann, A. A., E. Ratna, C. M. Sgro, M. Barton, M. Blacket, R. Hallas, S. De Garris & A. R. Weeks. 2007.** Antagonistic selection between adult thorax and wing size in field released *Drosophila melanogaster* independent of thermal conditions. J. Evol. Biol. 20: 2219-2227.

- Huey, R. B., G. W. Gilchrist, M. L. Carlson, D. Berrigan & L. Serra. 2000.** Rapid evolution of a geographic cline in size in an introduced fly. *Science* 287: 308-309.
- Imasheva, A. G., B. Moreteau & J. R. David. 2000.** Growth temperature and genetic variability of wing dimensions in *Drosophila*: opposite trends in two sibling species. *Genet. Res., Camb.* 76: 237-247.
- Imhof, M., B. Harr, G. Brem & C. Schlotterer. 1998.** Multiple mating in wild *Drosophila melanogaster* revisited by microsatellite analysis. *Mol. Ecol.* 7: 915-917.
- Jablonka, E. & M. J. Lamb. 1995.** Epigenetic Inheritance and Evolution. Oxford University Press, Oxford.
- Jablonka, E. & M. J. Lamb. 2005.** Evolution in four dimensions - Genetic, epigenetic, behavioral, and symbolic variation in the history of life. MIT Press, Cambridge.
- Jablonka, E. & M. J. Lamb. 2010.** Transgenerational Epigenetic Inheritance. In M. Pigliucci & G. B. Müller [eds.], *Evolution: The Extended Synthesis*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- James, A. C., R. B. R. Azevedo & L. Partridge. 1997.** Genetic and Environmental Responses to Temperature of *Drosophila melanogaster* From a Latitudinal Cline. *Genetics* 146: 881-890.
- Karan, D., B. Moreteau & J. R. David. 1999a.** Growth temperature and reaction norms of morphometrical traits in a tropical drosophilid: *Zaprionus indianus*. *Heredity* 83: 398-407.
- Karan, D., J. P. Morin, E. Gravot, B. Moreteau & J. R. David. 1999b.** Body size reaction norms in *Drosophila melanogaster*: temporal stability and genetic architecture in a natural population. *Genet. Sel. Evol.* 31: 491-508.
- Karan, D., A. K. Munjal, P. Gibert, B. Moreteau, R. Parkash & J. R. David. 1998.** Latitudinal clines for morphometrical traits in *Drosophila kikkawai*: a study of natural populations from the Indian subcontinent. *Genet. Res., Camb.* 71: 31-38.
- Kingsolver, J. G. & D. W. Pfennig. 2007.** Patterns and Power of Phenotypic Selection in Nature. *BioScience* 57: 561-572.
- Kirschner, M. & J. Gerhart. 2005.** The Plausibility of Life: Resolving Darwin's Dilemma. . Yale University Press, New Haven, Connecticut.
- Kjärsgaard, A., S. Faurby, D. H. Andersen, C. Pertoldi, J. R. David & V. Loeschcke. 2007.** Effects of temperature and maternal and grandmaternal age on wing shape in parthenogenetic *Drosophila mercatorum*. *Journal of Thermal Biology* 32: 59-65.
- Krag, K., H. Thomsen, S. Faurby, A. Kjärsgaard, M. Tejedo, V. Loeschcke & C. Pertoldi. 2009.** Consequences of outbreeding on phenotypic plasticity in *Drosophila mercatorum* wings. *Evol. Ecol.* 23: 403-415.
- Leblanc, L., P. M. O'Grady, D. Rubinoff & S. L. Montgomery. 2009.** New Immigrant Drosophilidae in Hawaii, and a Checklist of the Established Immigrant Species. *Proc. Hawaiian Entomol. Soc.* 41: 121-127.
- Leica 2003-2011.** Leica Application Suite (LAS) computer program, version 3.8.0. By Leica, Suíça.
- Lessells, C. M. & P. T. Boag. 1987.** Unrepeatable Repeatabilities: A Common Mistake. *The Auk* 104: 116-121.
- Liefting, M., A. A. Hoffmann & J. Ellers. 2009.** Plasticity versus environmental canalization: population differences in thermal responses along a latitudinal gradient in *Drosophila serrata*. *Evolution* 63: 1954-1963.

- Loeschcke, V., J. Bundgaard & J. S. F. Barker. 2000.** Variation in body size and life history traits in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii* from a latitudinal cline in eastern Australia. *Heredity* 85: 423-433.
- Loh, R., J. R. David, V. Debat & B. C. Bitner-Mathé. 2008.** Adaptation to different climates results in divergent phenotypic plasticity of wing size and shape in an invasive drosophilid. *Journal of Genetics* 87: 209-217.
- Marinho-Filho, J., R. B. Machado & R. P. B. Henriques. 2010.** Evolução do conhecimento e da conservação do Cerrado brasileiro. In I. R. Diniz, J. Marinho-Filho, R. B. Machado & R. B. Cavalcanti [eds.], *Cerrado: conhecimento científico quantitativo como subsídio para ações de conservação*. Thesaurus, Brasília.
- Markow, T. A. & P. M. O'Grady. 2005.** Evolutionary Genetics of Reproductive Behavior in *Drosophila*: Connecting the Dots. *Annual Review of Genetics* 39: 263-291.
- Markow, T. A. & P. M. O'Grady. 2006.** *Drosophila*: A guide to species identification and use. Academic Press, Londres.
- Markow, T. A., D. Bustoz & S. Pitnick. 1996.** Sexual selection and a secondary sexual character in two *Drosophila* species. *Animal Behaviour* 52: 759-766.
- Mata, R. A. 2007.** Drosophilid assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna., pp. 105, Departamento de Ecologia. Universidade de Brasília, Brasília.
- Mata, R. A. & R. Tidon. 2013.** The relative roles of habitat heterogeneity and disturbance in drosophilid assemblages (Diptera, Drosophilidae) in the Cerrado. *Insect Conservation and Diversity* 6: 663-670.
- Mata, R. A., M. McGeoch & R. Tidon. 2010.** Drosophilids (Insecta, Diptera) as Tools for Conservation Biology. *Natureza & Conservação* 8: 60-65.
- Matta, B. P. & B. C. Bitner-Mathé. 2004.** Genetic architecture of wing morphology in *Drosophila simulans* and an analysis of temperature effects on genetic parameter estimates. *Heredity* 93: 330-341.
- Maynard Smith, J. & E. Szathmary. 1995.** *The Major Transitions in Evolution*. W.H. Freeman, Oxford.
- Menezes, B. F., F. M. Vigoder, A. A. Peixoto, J. Varaldi & B. C. Bitner-Mathé. 2013.** The influence of male wing shape on mating success in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour* 85: 1217-1223.
- Merilä, J. & A. P. Hendry. 2014.** Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence. *Evolutionary Applications* 7: 1-14.
- Milkman, R. D. & R. R. Zeitler. 1974.** Concurrent multiple paternity in natural and laboratory populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 78: 1191-1193.
- Monteiro, L. R. 1999.** Multivariate Regression Models and Geometric Morphometrics: The Search for Causal Factors in the Analysis of Shape. *Systematic Biology* 48: 192-199.
- Moreteau, B., A. G. Imasheva, J. P. Morin & J. R. David. 1998.** Wing shape and developmental temperature in two *Drosophila* species: different wing regions exhibit different reaction norms. *Russian Journal of Genetics* 34: 183-192.
- Moreteau, B., J. P. Morin, P. Gibert, G. Pétavy, E. Pla & J. R. David. 1997.** Evolutionary changes of nonlinear reaction norms according to thermal adaptation: a comparison of two *Drosophila* species. *C. R. Acad. Sci. Paris* 320: 833-841.

- Morin, J. P., B. Moreteau, G. Pétavy & J. R. David. 1999.** Divergence of reaction norms of size characters between tropical and temperate populations of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. J. Evol. Biol. 12: 329-339.
- Morin, J. P., B. Moreteau, G. Pétavy, R. Parkash & J. R. David. 1997.** Reaction Norms of Morphological Traits in *Drosophila*: Adaptive Shape Changes in a Stenotherm Circumtropical Species? Evolution 51: 1140-1148.
- Müller, G. B. 2007.** Evo-devo: extending the evolutionary synthesis. Nature Reviews Genetics 8: 943-949.
- Müller, G. B. 2013.** Beyond Spandrels: Stephen J. Gould, EvoDevo, and the Extended Synthesis., pp. 85-99. In G. A. Danieli, A. Minelli & T. Pievani [eds.], Stephen J. Gould: The Scientific Legacy. Springer-Verlag, Milão, Itália.
- Müller, G. B. & S. A. Newman, eds. 2003.** Origination of Organismal Form. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Noach, E. J. K., G. de Jong & W. Scharloo. 1996.** Phenotypic plasticity in morphological traits in two populations of *Drosophila melanogaster*. J. Evol. Biol. 9: 831-844.
- Norry, F. M., O. A. Bublly & V. Loeschcke. 2001.** Developmental time, body size and wing loading in *Drosophila buzzatii* from lowland and highland populations in Argentina. Hereditas 135: 35-40.
- Nunney, L. & W. Cheung. 1997.** The Effect of Temperature on Body Size and Fecundity in Female *Drosophila melanogaster*: Evidence for Adaptive Plasticity. Evolution 51: 1529-1535.
- Odling-Smee, F. J., K. N. Laland & M. W. Feldman. 2003.** Comments on Niche Construction: The Neglected Process in Evolution. Princeton University Press, Princeton, Nova Jersey.
- Partridge, L. 1988.** Lifetime reproductive Success in *Drosophila*., pp. 548p. In T. H. Clutton-Brock [ed.], Reproductive Success: Studies of Individual Variation in Contrasting Breeding Systems. The University of Chicago Press, Chicago.
- Partridge, L. & K. Fowler. 1993.** Responses and Correlated Responses to Artificial Selection on Thorax Length in *Drosophila melanogaster*. Evolution 47: 213-226.
- Pennisi, E. 2008.** Modernizing the Modern Synthesis. Science 321: 196-197.
- Pennycuik, C. J. 1968.** A wind-tunnel study of gliding flight in the pigeon *Columba livia*. J. Exp. Biol. 49: 509-526.
- Pétavy, G., J. P. Morin, B. Moreteau & J. R. David. 1997.** Growth temperature and phenotypic plasticity in two *Drosophila* sibling species: probable adaptive changes in flight capacities. J. Evol. Biol. 10: 875-887.
- Pigliucci, M. 2001.** Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Pigliucci, M. 2010.** Phenotypic Plasticity. In M. Pigliucci & G. B. Müller [eds.], Evolution: The Extended Synthesis. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Pigliucci, M. & G. B. Müller, eds. 2010.** Evolution: The Extended Synthesis. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Pitchers, W., J. E. Pool & I. Dworkin. 2012.** Altitudinal clinal variation in wing size and shape in african *Drosophila melanogaster*: one cline or many? Evolution 67: 438-452.
- Powell, A. M., M. Davis & J. R. Powell. 2010.** Phenotypic plasticity across 50 MY of evolution: *Drosophila* wing size and temperature. Journal of Insect Physiology 56: 380-382.

- Powell, J. R. 1997.** Progress and Prospects in Evolutionary Biology: The *Drosophila* Model. Oxford Univ. Press, Nova Iorque.
- Prasad, B. R. G., S. N. Hedge & M. S. Krishna. 2008.** Positive relation between male size and remating success in some populations of *Drosophila bipectinata*. Zoological Studies 47: 75-83.
- Quinn, G. P. & M. J. Keough. 2002.** Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rocha, F. & L. B. Klaczko. 2012.** Connecting the dots of nonlinear reaction norms unravels the threads of genotype-environment interaction in *Drosophila*. . Evolution 66: 3404-3416.
- Rocha, F., H. F. Medeiros & L. B. Klaczko. 2009.** The reaction norm for abdominal pigmentation and its curve in *Drosophila mediopunctata* depend on the mean phenotypic value. Evolution 63: 280-287.
- Roff, D. A. 1997.** Evolutionary Quantitative Genetics. Chapman and Hall, Nova Iorque.
- Rohlf, F. J. 1993.** Relative warp analysis and an example of its application to mosquito wings., pp. 131-158. In L. F. Marcus, E. Bello & A. Garcia-Valdecasas [eds.], Contributions to Morphometrics. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas, Madrid.
- Rohlf, F. J. 2010a.** tpsDig computer program, version 2.16. By Rohlf, F. J., Nova Iorque.
- Rohlf, F. J. 2010b.** tpsRw1 computer program, version 1.49. By Rohlf, F. J., Nova Iorque.
- Rohlf, F. J. 2011.** tpsRegr computer program, version 1.40. By Rohlf, F. J., Nova Iorque.
- Rohlf, F. J. & D. E. Slice. 1990.** Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. Syst. Zool. 39: 40-59.
- Rohlf, F. J. & L. F. Marcus. 1993.** A revolution in morphometrics. Trends Ecol. Evol. 8: 129-132.
- Roque, F., R. A. Mata & R. Tidon. 2013.** Temporal and vertical drosophilid (Insecta; Diptera) assemblage fluctuations in a neotropical gallery forest. Biodivers. Conserv. 22: 657-672.
- Sambucetti, P., V. Loeschcke & F. M. Norry. 2006.** Developmental time and size-related traits in *Drosophila buzzatii* along an altitudinal gradient from Argentina. Hereditas 143: 77-83.
- Schlichting, C. D. 2002.** Phenotypic plasticity in plants. Plant Sp. Biol. 17: 85-88.
- Schlichting, C. D. & M. Pigliucci. 1998.** Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective. Sinauer, Sunderland.
- Schlichting, C. D. & M. A. Wund. 2014.** Phenotypic plasticity and epigenetic marking: an assessment of evidence for genetic accommodation., Evolution.
- Schoener, T. W. 2011.** The Newest Synthesis: Understanding the Interplay of Evolutionary and Ecological Dynamics. Science 331: 426-429.
- Simmons, L. W. 2001.** Sperm Competition and its Evolutionary Consequences in the Insects. Princeton University Press, Princeton, Nova Jersey.
- Snodgrass, R. E. 1993.** Principles of Insect Morphology. Cornell University Press, Ithaca, Nova Iorque.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf. 1995.** Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Co., Nova Iorque.
- Soto, E. M., I. M. Soto, M. D. Cortese & E. Hasson. 2011.** Oviposition site preferences and performance in natural resources in the human commensals *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. Fly 5: 102-109.

- Stalker, H. D. 1980.** Chromosome studies in wild populations of *Drosophila melanogaster*. II. Relationship of inversion frequencies to latitude, season, wing-loading and flight activity. *Genetics* 95: 211–223.
- Starmer, W. T. & L. L. Wolf. 1989.** Causes of variation in wing loading among *Drosophila* species. *Biological Journal of the Linnean Society* 37: 247-261.
- StatSoft 2005.** STATISTICA (data analysis software system) computer program, version 7.1. By StatSoft.
- Stearns, S. C. 1992.** *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford.
- Stern, D. L. & D. J. Emlen. 1999.** The developmental basis for allometry in insects. *Development* 126: 1091-1101.
- Sturtevant, A. H. 1942.** The classification of the genus *Drosophila*: with descriptions of nine new species, pp. 5-51, Univ. of Texas Publication.
- Tennekes, H. 2009.** *The Simple Science of Flight: From Insects to Jumbo Jets*. MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Thomas, R. H. 1993.** Ecology of body size in *Drosophila buzzatii*: untangling the effects of temperature and nutrition. *Ecol. Entomol.* 18: 84-90.
- Tidon, R. 2006.** Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. *Biological Journal of the Linnean Society* 87: 233-247.
- Valadão, H. 2013.** Associação entre drosofilídeos (Insecta: Diptera) e frutos como sítios de criação larval., pp. 140, Departamento de Ecologia. Universidade de Brasília, Brasília.
- Valadão, H., J. D. V. Hay, and R. Tidon. 2010.** Temporal Dynamics and Resource Availability for Drosophilid Fruit Flies (Insecta, Diptera) in a Gallery Forest in the Brazilian Savanna. *International Journal of Ecology* 2010: 1-7.
- Vilela, C. R., A. F. G. Silva & F. M. Sene. 2002.** Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. III. The *cardini* group. *Revista Brasileira de Entomologia* 46: 139-148.
- Violle, C., B. J. Enquist, B. J. McGill, L. Jiang, C. H. Albert, C. Hulshof, V. Jung & J. Messier. 2012.** The return of the variance: intraspecific variability in community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 27: 244-252.
- West-Eberhard, M. J. 2003.** *Developmental plasticity and evolution*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Whitman, D. W. & A. A. Agrawal. 2009.** What is phenotypic plasticity and why is it important?, pp. 1-63. *In* D. W. Whitman & T. N. Ananthakrishna [eds.], *Phenotypic plasticity of insects: mechanisms and consequences*. Science Publishers, Inc., Enfield.
- Willi, Y. & A. A. Hoffmann. 2012.** Microgeographic adaptation linked to forest fragmentation and habitat quality in the tropical fruit fly *Drosophila birchii*. *Oikos* 121: 1627-1637.
- Wootton, R. J. 1992.** Functional Morphology of Insect Wings. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 113-140.
- Wund, M. A. 2012.** Assessing the Impacts of Phenotypic Plasticity on Evolution. *Integrative and Comparative Biology* 52: 5-15.
- Yadav, J. P. & B. N. Singh. 2005.** Evolutionary genetics of *Drosophila ananassae* III. Effect of temperature on certain fitness traits in two natural populations. *Journal of Thermal Biology* 30: 457-466.
- Zar, J. H. 1999.** *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, Nova Jersey.

Zelditch, M. L., D. L. Swiderski, H. D. Sheets & W. L. Fink. 2004. Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. Elsevier Academic Press, Nova Iorque e Londres.

8. Anexo

Tabela A1. Estimativas dos parâmetros (g_0 , g_1 , g_2 e g_3) dos modelos que forneceram os melhores ajustes para tamanho da asa (Asa), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão). Os valores médios das estimativas são seguidos do erro padrão (e.p.) e do coeficiente de variação (CV).

	Ajuste		Média	e.p.	CV
Asa	Quadrático	g_0	2,1722	0,3201	32,95
		g_1	0,1263	0,0319	56,48
		g_2	0,0039	0,0008	43,82
Tórax	Quadrático	g_0	0,5473	0,1786	72,97
		g_1	0,0680	0,0178	58,54
		g_2	0,0018	0,0004	52,95
Razão	Linear	g_0	2,9766	0,0343	2,58
		g_1	0,0162	0,0016	21,86
	Cúbico	g_0	4,5559	0,0484	2,38
		g_1	0,2503	0,0073	6,54
		g_2	0,0112	0,0004	7,17
		g_3	0,0002	0,0000	7,37

Tabela A2. Valores dos coeficientes de variação (CV), em porcentagem, calculados por linhagem e temperatura de desenvolvimento (°C) para tamanho do centroide (Asa - centroide), RW1 (Asa – RW1), RW2 (Asa – RW2), tamanho do tórax (Tórax) e razão asa:tórax (Razão).

Linhagem		Temperatura				
		14	17	21	25	28
Asa – centroide	3	—	—	—	—	—
	4	4,1	2,4	3,4	2,5	3,2
	9	4,6	2,6	1,8	2,6	2,4
	10	3,0	2,5	2,0	2,6	2,9
	12	—	—	—	—	—
	14	2,8	1,8	3,3	4,7	7,0
	15	3,9	2,8	3,8	2,7	3,9
	16	0,7	3,9	2,0	3,3	2,6
	17	3,7	2,5	2,7	5,4	2,6
	18	1,5	2,3	3,0	4,2	2,7
	21	3,8	2,7	2,7	3,1	3,0
	22	0,6	2,5	1,6	3,4	5,4
Asa – RW1	3	—	—	—	—	—
	4	42,8	184,8	100,0	51,4	86,7
	9	24,0	70,6	172,3	116,5	73,2
	10	8,7	58,4	136,4	342,3	96,4
	12	—	—	—	—	—
	14	25,7	39,2	58,8	83,3	200,8
	15	44,1	175,8	497,6	53,0	87,4
	16	21,5	166,8	150,9	163,7	83,5
	17	78,1	191,2	104,8	261,7	140,0
	18	24,5	84,3	178,3	809,8	127,8
	21	16,9	80,4	551,2	194,2	209,9
	22	32,4	344,7	75,3	87,7	168,7

Linhagem		Temperatura				
		14	17	21	25	28
Asa – RW2	3	—	—	—	—	—
	4	27,9	50,5	657,6	160,8	393,8
	9	28,9	79,3	247,5	156,0	470,0
	10	29,0	103,5	581,5	349,0	116,6
	12	—	—	—	—	—
	14	81,0	150,2	173,1	69,1	83,7
	15	51,4	31,5	105,5	681,2	864,1
	16	47,7	374,8	155,1	152,6	512,9
	17	50,8	476,1	101,3	46,8	46,8
	18	24,0	341,7	123,3	84,8	126,2
	21	348,0	215,6	63,0	67,6	163,5
	22	48,5	82,8	197,4	24040,0	265,0
Tórax	3	3,7	3,1	3,5	3,3	3,8
	4	2,5	2,7	3,8	2,9	3,4
	9	4,7	2,9	3,1	3,6	4,6
	10	3,3	2,5	4,6	2,8	3,2
	12	1,8	3,0	3,6	3,5	5,4
	14	3,0	1,8	3,5	4,0	6,4
	15	4,7	2,6	3,8	3,1	4,0
	16	1,6	4,5	2,7	3,9	3,3
	17	4,9	3,4	2,9	4,5	2,6
	18	2,3	2,3	3,4	4,0	1,3
	21	5,9	2,7	2,9	4,0	2,2
	22	4,3	3,4	2,0	4,9	6,1

Linhagem		Temperatura				
Razão		14	17	21	25	28
	3	—	—	—	—	—
	4	4,4	1,4	2,1	1,8	2,1
	9	0,2	2,2	2,4	2,3	0,6
	10	4,8	1,5	2,0	2,3	1,1
	12	—	—	—	—	—
	14	1,9	2,5	2,9	2,1	2,7
	15	2,8	2,1	1,7	2,8	2,3
	16	2,6	2,6	1,9	2,3	3,4
	17	2,8	1,9	2,7	2,7	2,0
	18	3,8	2,4	1,9	1,1	3,0
	21	4,5	2,3	2,9	3,2	3,4
	22	2,0	2,6	1,9	3,0	3,2

Tabela A3. Estimativas dos parâmetros (g_0 , g_1 , g_2 e g_3) dos modelos que forneceram os melhores ajustes para o coeficiente de variação (CV) do tamanho da asa (Asa) e do tamanho do tórax (Tórax) de diferentes linhagens. Os valores médios das estimativas são seguidos do erro padrão (e.p.) e do CV.

	Linhagem	Ajuste		Média	e.p.	CV
Asa	14	Linear	g_0	-2,618	2,009	171,64
			g_1	0,311	0,093	66,95
	21	Cúbico	g_0	39,628	2,131	12,03
			g_1	-5,185	0,322	13,89
			g_2	0,237	0,016	14,84
			g_3	-0,004	0,000	15,82
	22	Linear	g_0	-3,322	1,829	123,11
			g_1	0,286	0,085	66,25
Tórax	12	Linear	g_0	-0,883	1,154	292,36
			g_1	0,206	0,053	57,92
	21	Cúbico	g_0	123,358	2,143	3,88
			g_1	-17,426	0,324	4,16
			g_2	0,823	0,016	4,30
			g_3	-0,013	0,000	4,42